



(aus: B. Grzimek, 1980)

STRUKTURELLE KORRELATE DES GESANGSLERNENS BEI VÖGELN:
Eine entwicklungsbiologische cytomorphometrische Analyse unter besonderer
Berücksichtigung telencephaler Zentren

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Zoologie

vorgelegt dem Fakultätsrat
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. rer. nat. Barbara Emilie Nixdorf-Bergweiler, geb. Nixdorf
geb. am 27. Oktober 1952 in Detmold

Prof. Dr. Dr. h.c. Hans Meyer
Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. B. Ronacher
Dekan

Berlin, den 19. 07. 2000

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 18. 07. 2001

Gutachter:

1. Prof. Dr. Harald Saumweber
2. Prof. Dr. Onur Güntürkün
3. Prof. Arthur P. Arnold, Ph.D

VORWORT

Die vorliegende Habilitationsschrift entstand in der Abteilung Sinnesbiologie des Instituts für Biologie der Humboldt Universität in Berlin. Ich danke Herrn Professor A. Elepfandt, der meiner Arbeit großes Interesse entgegenbrachte und mir die Umsetzung meiner wissenschaftlichen Ideen in seiner Abteilung ermöglichte. Ich habe in dieser Zeit viele wertvolle interessante und konstruktive Gespräche mit ihm geführt. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Professor U. Heinemann bedanken, der mich in vielfältiger Weise in meinem Forschungsvorhaben unterstützte.

Einige der hier dargestellten methodischen Ansätze und Ideen wurden bereits in einem USA-Aufenthalt an der Rockefeller Universität in New York (New York) bei Herrn Professor F. Nottebohm und in einem weiteren USA-Aufenthalt an der Cornell Universität in Ithaca (New York) bei Herrn Professor T. J. DeVoogd entwickelt und erarbeitet. Für die vielen wertvollen und interessanten Diskussionen und Gespräche in dieser Zeit bin ich ihnen sehr dankbar. Auch danke ich den Professoren Frau B. Finlay und Frau E. Adkins-Regan für hilfreiche Diskussionen.

An den Medizinischen Einrichtungen der Universität in Köln habe ich am Institut für Neurophysiologie bei Herrn Professor U. Heinemann mit dem Aufbau elektrophysiologischer Techniken begonnen, die hier an der Humboldt Universität erfolgreich fortgesetzt werden konnten. Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor U. Heinemann bedanken, daß er meine wissenschaftlichen Arbeiten am Gesangssystem der Vögel in Köln förderte und mich in vielfältiger Weise unterstützte. Für die zahlreichen interessanten und anregenden Gespräche, Diskussionen und Hilfestellungen während dieser Zeit danke ich den Herren Prof. H. Luhmann, Dr. E. Ficker, Dr. M. Leweke, Dr. T. Mittmann und Frau Dr. C. Eder. Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Herrn Professor F. W. Klußmann für sein Interesse an meiner Arbeit und seine hilfreiche Unterstützung bedanken. Große Dienste erwies mir Frau S. Schultze durch ihre hervorragende technische Assistenz.

Hier an der Humboldt Universität habe ich außer von den bereits genannten Professoren A. Elepfandt und U. Heinemann auch von vielen anderen Seiten große Unterstützung erfahren. So möchte ich mich für verschiedene fachliche Diskussionen bei den Herren Professor H. Saumweber und Professor B. Ronacher bedanken. Meine elektronenmikroskopischen Arbeiten werden von Prof. R. Lucius und Priv.-Doz. Dr. W. Bleiss

unterstützt, wofür ich sehr dankbar bin. Auch Professor H. Veh bin ich zu großem Dank verpflichtet. Herrn Professor A. Herz danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, sowie seinen Mitarbeitern Dipl.-Phys. C. Machens und Dr. H. Schütze für ihre Hilfestellung bei verschiedenen Computerarbeiten. Den Mitarbeitern von Prof. U. Heinemann, Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Draguhn, Dr. J. Behr, Dr. T. Gloveli, Dr. S. und H.-J. Gabriel, danke ich für ihre Unterstützung bei meinen elektrophysiologischen Studien. Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilung Sinnesbiologie Herrn Dr. J. Strake und Dr. S. Tuschick bedanken, die mich in diverse Computerprogramme einarbeiteten, sowie bei Herrn Priv.-Doz. Dr. S. Krackow, der mich in Fragen zur Statistik beriet. Herrn Dr. K.-H. Frommolt und Herrn A. Gnensch danke ich für ihre Unterstützung beim Aufbau zur Analyse bioakustischer Parameter von Gesangsstrukturen beim Zebrafinken. Mein besonderer Dank gilt auch meinen Mitarbeitern Frau Dipl.-Biol. V. Hintz und Frau Dipl.-Biol. C. Freyer, sowie den Herren Dipl.- Biol. M. B. Lips, G. Kreck und D. Sandakov und Herrn A. Bindrich, die mit viel experimentellem Geschick zu interessanten Ergebnissen dieser Arbeit beitrugen. Auch den noch nicht genannten Mitarbeitern der Abteilung Sinnesbiologie Frau Dr. B. Lange, Dr. B. Tzschentke, Dipl.-Phys. A. Gebler, B. Eitner und ganz besonders Frau U. Schneeweiß, die mich in vielfältiger Weise unterstützten, möchte ich meinen Dank aussprechen.

Für die hilfreichen Diskussionen und Gespräche innerhalb des Sonderforschungsbereich 515 möchte ich mich bei den Herren Professoren U. Heinemann und R. Menzel (FU Berlin), sowie bei den Professorinnen Frau G. Ahnert-Hilger und Frau R. Grantyn ganz herzlich bedanken. Ebenso gebührt Herrn Dr. F. W. Pfrieger (Max-Delbrück-Centrum) mein besonderer Dank. Herrn Prof. U. Scheer (Universität Würzburg) und Frau Prof. H. Williams (Williams College, MA), sowie auch Frau Dr. B. Diekamp (Ruhr-Universität Bochum) danke ich für spezifische fachliche Unterstützung. Weiter möchte ich mich bei Frau Dr. E. Wallhäußer-Franke (TH Darmstadt) für ihre große Diskussionsbereitschaft bedanken. Ganz besonderen Dank gebührt Herrn Prof. H. Scheich (MFN, Magdeburg) für sein Interesse an meiner Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann, Herrn Prof. Walter Bergweiler, für seine große Unterstützung und meiner Tochter Lena für Ihre Geduld, sowie meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	6
I. <i>Einführung</i>	8
1. 1. Neuronale Grundlagen des Vogelgesangs als Modell für entwicklungs- und erfahrungsabhängige Plastizität	8
1. 2. Vergleichende Betrachtungen von Sprach- und Gesangssystem	9
1. 3. Das Gesangssystem bei Vögeln	11
1. 3. 1. Verhaltensbiologische Grundlagen des Gesangslernens bei Vögeln	11
1. 3. 2. Die Rolle der auditorischen Rückkopplung	12
1. 3. 3. Das Gesangslernen bei Zebrafinken (<i>Taeniopygia guttata</i>)	14
1. 3. 4. Neuronale Verschaltungen des Gesangssystems	18
1. 3. 5. Funktionelle Bedeutung spezifischer Kernregionen im Gesangssystem	21
1. 4. Die Fragestellung: Neuronale Korrelate des Gesangslernens bei Zebrafinken.	24
II. <i>Morphogenese und neuronale Konnektivität telencephale Strukturen im Gesangssystem des Zebrafinken</i>	
2. 1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Größe von Kernregionen und dem Gesangsverhalten?	29
2. 2. Cytomorphometrische Charakterisierung der Entwicklung neuronaler Strukturen im LMAN, einer Kernregion, die an Lernprozessen beteiligt ist.	34
2. 3. Aufklärung neuronaler Verbindungen <i>in vivo</i> und am <i>in vitro</i> Hirnschnittpräparat weisen neue Projektionen auf	55

III.	<i>Einfluß der Gesangsdeprivation bei Zebrafinken:</i>	
	<i>Verhaltensbiologische und neuroanatomische Untersuchungen.</i>	65
3. 1.	Störungen im Frequenz- und Zeitmuster des Gesangsrepertoires	66
3. 2.	Auswirkungen der Gesangsdeprivation auf das dendritische Verzweigungsmuster von Neuronen und synaptischen Kontakten im LMAN als erster Nachweis eines morphologisch identifizierten neuronalen Korrelats des Gesangslernens	68
3. 3.	Effekte der Gesangsdeprivation auf die neuronale Organisation der anterioren Vorderhirnschleife: Weitere morphologische Belege für neuronale Korrelate des Gesangslernens	72
IV.	<i>Untersuchungen zur Steroidsensitivität und zum Sexualdimorphismus beim Kanarienvogel</i>	
4. 1.	Welchen Einfluß hat Testosteron auf die Synaptogenese in Gesangskernen bei Weibchen?	80
4. 2.	Welche Neuronentypen gibt es im HVC und sind diese sexualdimorph?	82
V.	<i>Literatur zum Habilitationsthema</i>	
5. 1.	Eigene Originalartikel	91
5. 2.	Abstracts neuerer eigener Arbeiten	92
5. 3.	Betreute Arbeiten	93
5. 4.	Zitierte Literatur	94
VI.	<i>Weitere Publikationen der Habilitandin</i>	107
VII.	<i>Sonderdrucke und Manuskript</i>	108

ZUSAMMENFASSUNG

In der Arbeit werden anhand neuroanatomischer und elektrophysiologischer Techniken neuronale Korrelate zum Gesangslernen bei Vögeln untersucht. Das erste Kapitel dient der allgemeinen Einführung in die Thematik und soll das Gesangssystem der Vögel als ein Modellsystem vorstellen, mit dem Fragen zu neuronalen Entwicklungsmechanismen untersucht werden können, die letztendlich Grundlage biologisch relevanter Verhaltensweisen bilden.

Im zweiten Kapitel wird mit verschiedenen cytomorphometrischen Methoden die Entwicklung verschiedener neuronaler Parameter vor, während und nach dem Gesangslernen erfaßt. Bei diesen licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen telencephaler Gesangskerne wurde vor allem der laterale magnocelluläre Nucleus des anterioren Neostriatums (LMAN) analysiert, der wesentlich am Gesangslernen beteiligt sein soll. Mit diesen Befunden, dargestellt in Abschnitt 2. 2., sollen Zusammenhänge zwischen neuronalen Parametern und Lernprozessen aufgezeigt werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im LMAN fast alle untersuchten Parameter mit dem 60. Tag ihren Adultwert erreicht haben, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Gedächtnisbildungsphase abgeschlossen und die sensorimotorische Phase auf ihrem Höhepunkt ist. Andererseits verringert sich die Anzahl dendritischer Spines (entlang eines Dendriten) weiter und eine Zunahme an Myelin ist ebenso auch noch nach dem 60. Tag im LMAN meßbar, was dafür spricht, daß neuronale Plastizität bis ins Adultstadium aufrechterhalten wird. Bei der Untersuchung der neuronalen Konnektivität adulter Zebrafinken am *in vitro* Hirnschnittpräparat konnten wir mit elektrophysiologischen Techniken eine neue Projektion vom LMAN in die area X bei Männchen identifizieren. Anhand von Tracerstudien konnte eine solche Projektion am Hirnschnittpräparat auch bei Weibchen nachgewiesen werden. Ebenso wurden für den RA neue Verbindungen aufgezeigt, Befunde, die in Abschnitt 2. 3. dargestellt sind.

Um den Einfluß auditorischer Erfahrung auf die neuronale Entwicklung zu untersuchen, wurden Tiere ohne ein Gesangsvorbild aufgezogen (gesangsdeprivierte Zebrafinken). Die Ergebnisse hierzu sind in Kapitel 3 dargestellt. Der Gesang solcher deprivierter Tiere unterscheidet sich hinsichtlich der Frequenz-Zeit-Struktur von normalem Zebrafinkengesang. Die Positionierung der Einleitungselemente zu Beginn einer Strophe kann als eine genetische Prädisposition angesehen werden, die Zeitstruktur eines

Einleitungselements muß dagegen erlernt werden, da Gesangsdeprivation einen signifikanten Effekt auf die Dauer und Periodendauer des Einleitungselements aufweist. Auch auf neuronaler Ebene unterscheiden sich gesangsdeprivierte Tiere von normal aufgezogenen Tieren. In Abschnitt 3. 2 wird gezeigt, daß in gesangsdeprivierten Zebrafinkenmännchen die Anzahl dendritischer Spines im LMAN während der Gesangsentwicklungsphase nicht abnimmt wie wir es für sozial aufwachsende Tiere nachgewiesen haben und können so einen kausalen Zusammenhang zwischen adäquaten Reizmuster und Gedächtnisbildungsphase (Akquisitionsphase) aufzeigen. Auf andere untersuchten neuronalen Parameter hat Gesangsdeprivation im LMAN keinen Einfluß. Andererseits konnten in gesangsdeprivierten Männchen signifikante Unterschiede in der Größe der Gesangskerne DLM und HVC festgestellt werden, deren Bedeutung in Abschnitt 3. 3 diskutiert wird.

Der LMAN gesangsdeprivierter Weibchen wurde ebenso analysiert, um unsere Hypothese, daß der LMAN bei Weibchen an der Gedächtnisbildung für ein Gesangsmuster beteiligt ist, zu überprüfen. Es konnten entgegen den Erwartungen keine Unterschiede zu sozial aufgezogenen Weibchen in den untersuchten Parametern aufgezeigt werden. Andererseits treten bei Weibchen starke Unterschiede im RA auf: gesangsdeprivierte Weibchen weisen ein weitaus kleineres RA-Volumen auf, haben kleinere Zellkörper und eine höhere Zelldichte als Weibchen, die mit einem Gesangsmodell aufwachsen - ein Befund, der die Rolle des RAs bei Weibchen neu definiert.

Im vierten Kapitel wird am Beispiel des Kanarienvogels gezeigt, welchen Einfluß Testosteron auf das Gesangsverhalten und die damit einhergehenden neuronalen Veränderungen in adulten Weibchen hat und ob der für das HVC-Volumen bekannte Sexualdimorphismus sich auch in einzelnen Neuronentypen widerspiegelt.

Kapitel 1

Einführung

1. 1. Neuronale Grundlagen des Vogelgesangs als Modell für entwicklungs- und erfahrungsabhängige Plastizität

Eine der zentralen Fragen in den Neurowissenschaften beschäftigt sich damit, wie das Gehirn Erfahrung eines Organismus verarbeitet, speichert und wieder abrufen, um diese Erfahrung letztendlich in eine Verhaltensänderung umzusetzen. Wurden diese Fragen bisher vor allem an Lernparadigmen in erwachsenen Tieren untersucht, so belegen neuere Befunde, daß Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen neuronalen Plastizität ebenso sehr wohl Einblicke in die Mechanismen liefern, wie Erfahrung im Nervensystem abgespeichert wird (Constantin-Paton et al., 1990; Shatz, 1996; Nordeen und Nordeen, 1997). In der frühen Ontogenese sensorischer Systeme bei Vertebraten, zum Beispiel, nimmt Erfahrung eine Schlüsselposition in der Organisation des Nervensystems ein. Der Einfluß dieser frühen Erfahrung hinterläßt charakteristische Veränderungen in den synaptischen Strukturen und Verbindungen, die oft größer sind als die in erwachsenen Tieren aufgrund von Lernen hervorgerufenen Veränderungen. Der Einfluß dieser frühen Erfahrung auf die Entwicklung der neuronalen Organisation hängt oftmals auch von der Art und dem genauen Zeitpunkt der sensorischen Stimulation ab, womit ein Zeitfenster für aktivitätsabhängige synaptische Veränderung vorgegeben ist: die synaptischen Veränderungen finden innerhalb einer kritischen Phase statt. Untersuchungen zu entwicklungsabhängiger neuronaler Plastizität und zu Lernprozessen im erwachsenen Tier lassen vermuten, daß durch Erfahrung in beiden Prozessen (entwicklungsbedingte Plastizität und erfahrungsabhängige Plastizität) ähnliche neuronale Mechanismen zu einer Veränderung von neuronaler Struktur führen.

Für die Untersuchung neuronaler Entwicklungsmechanismen, die die Grundlage biologisch relevanter Verhaltensweisen bilden, hat sich das Gesangssystem der Vögel als ein ausgezeichnetes Modellsystem bewährt, das dem experimentellen Ansatz viele Vorteile bietet: (1) beim Gesangslernen handelt es sich um einen Lernvorgang, der über bestimmte neuronale Bahnen gesteuert wird, (2) die in bestimmten Phasen stattfindende Gesangsentwicklung kann zur Entwicklung der zugrundeliegenden neuronalen Bahnen in Beziehung gesetzt werden, (3) dem Gesang liegt ein stereotyped motorisches Programm

zugrunde, das hierarchisch mit prämotorischen und motorischen Kernen aufgebaut ist, (4) der Gesang sowie die zugrunde liegenden neuronalen Verschaltungen sind sexualdimorph, (5) Geschlechtshormone haben einen maßgeblichen Einfluß auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung der neuronalen Bahnen für Gesang, sowie auch auf das Gesangsverhalten, (6) es gibt extensive neuronale Plastizität im erwachsenen Tier, einschließlich Neurogenese und saisonale morphologische Veränderungen (Übersicht in Brenowitz et al., 1997). Diese Vielfalt an Möglichkeiten experimentell in ein System einzugreifen, hat das Gesangssystem zu einem viel genutzten, bewährten Modellsystem ausreifen lassen.

1. 2. Vergleichende Betrachtungen von Sprach- und Gesangssystem

Ein weiterer Aspekt, der die Untersuchungen des Gesangslernen bei Vögeln so attraktiv gestaltet, sind die Gemeinsamkeiten zur Sprachentwicklung des Menschen. Unter Säugern ist es im allgemeinen nicht üblich, daß vokalmotorisches Lernen vom auditorischen Eingang der eigenen Lautäußerungen wie auch von den Lautäußerungen anderer abhängig ist, um ein Vokalisationsrepertoire aufzubauen. Der Mensch nimmt hier mit seiner Sprachentwicklung eine Sonderstellung ein. Untersuchungen an Kindern (Stoel-Gammon und Otowo, 1986) und an Singvögeln (Doupe und Kuhl, 1999) haben gezeigt, daß Vokalmotorik sich nur dann entwickeln kann, wenn die Individuen das Lautrepertoire anderer sowie ihre eigene Vokalisation hören können. Taube Kinder zeigen normalerweise keine für die Sprachentwicklung typische 'Plapperphase' (Oller und MacNeilage, 1983), ebensowenig tritt diese Phase bei vertäubten Vögeln auf (Konishi, 1965; Nottebohm, 1967). Die auditorische Rückkopplung ist aber nicht nur für die Entwicklung von Sprache notwendig, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Sprachfähigkeit. Wenn Erwachsene ertauben, dann verändert sich allmählich ihre Vokalmotorik bis hin zur Unkenntlichkeit (Cowie und Douglas-Cowie 1992), ebenso wie ein Gesangsmuster seine ursprüngliche Struktur vollends verlieren kann (Nordeen und Nordeen 1992). Der Erwerb motorischer Sprachprogramme ist beim Menschen auf eine bestimmte Zeit (sensible Phase) während der Entwicklung beschränkt, ebenso verhält es sich mit der Gesangsentwicklung bei Vögeln. Ein in früher Jugend erworbenes Sprachmuster bzw. Gesangsmuster läßt sich im erwachsenen Individuum nur sehr schwer verändern (Kuhl, 2000). Bei den Singvögeln bezieht sich diese Aussage allerdings nur auf solche Arten, die im erwachsenen Tier ein starres Gesangsmuster aufweisen, wie z.B. einige Finkenarten. Ein weiteres gemeinsames Merkmal ist der Zeitverlauf für den Sprach- bzw.

Gesangserwerb, findet doch die Musterlegung vokalisationsspezifischer Elemente lange vor der vokalmotorischen Phase statt. Für den Menschen konnte bereits bei einjährigen Kindern sprachspezifische Muster in der Sprachproduktion anhand von Spontanäußerungen festgestellt werden (de Boysson-Bardies, 1993). Neuere Untersuchungen zeigen, daß Kleinkinder bereits mit 20 Wochen Vokale weitaus deutlicher aussprechen als mit 12 Wochen (Kuhl und Meltzoff, 1996) und daß diese Leistung durch Zuhören und Nachahmung erreicht wird. Um einen bestimmten Vokal in seiner Aussprache zu verbessern, reicht eine sehr kleine Zeitspanne von nur 15 Minuten bereits aus. Auch bei Vögeln konnte mit einer sehr kleinen Anzahl von Expositionen eines Gesangsmusters ein Lernerfolg bei der motorischen Gesangsdarbietung erzielt werden. So sind bei Zebrafinken z.B. durch Vorspielen eines Gesangsmusters von insgesamt nur 30 Sekunden in der sensiblen Phase des Gesangslernens, verteilt auf 40 einzelne Darbietungen, ausreichend, um dann später im adulten Tier dieses Gesangsmuster selber so zu singen (Tchernichovski et al., 1999). Ein ähnlicher Befund wurde auch bei Nachtigallen festgestellt (Hultsch und Todt, 1989, 1996). Aufgrund von auditorischer und sehr wahrscheinlich auch visueller Erfahrung wird ein Gedächtnis des Vokalisationsmusters gebildet und ein solches Muster steuert letztendlich sensomotorisches Lernen von Sprache beim Menschen, sowie die Gesangsproduktion bei Vögeln (Adret, 1993; Kuhl, 2000).

Nicht nur auf der Verhaltensebene lassen sich in der Gesangsentwicklung bei Vögeln Gemeinsamkeiten zur Sprachentwicklung beim Menschen aufzeigen. Auch auf der neuronalen Ebene gibt es Parallelen zwischen dem Sprachsystem und dem Gesangssystem. Wie beim Menschen so haben sich auch bei Singvögeln spezifische Gehirnregionen im Laufe der Evolution entwickelt, die für den Gesangserwerb und für die motorische Koordination von Lautäußerungen eine wichtige Rolle spielen (Iyengar et al., 1999; Kuhl, 2000). Neuere Techniken und Bildanalysesysteme zeigen, daß beim Menschen neben den klassischen Sprachzentren, wie das Broca und Wernicke Areal, auch noch andere Gehirnareale bei der Sprachverarbeitung eine wichtige Rolle spielen. Auch beim Vogel gibt es für das Gesangslernen und für die Gesangsproduktion spezifische Kernregionen. Auch findet sich in einigen Vogelarten wie z.B. dem Kanarienvogel eine Hemisphärendominanz vor (Nottebohm et al., 1976), wie es auch für die Sprachrepräsentation bekannt ist. Aufgrund dieser Betrachtungen kann das Gesangssystem auch für die Sprachentwicklung Modellcharakter haben.

1. 3. Das Gesangssystem bei Vögeln

1. 3. 1. Verhaltensbiologische Grundlagen des Gesangslernens

Singvögel (Oscines) müssen ihren Gesang erlernen und diese Fähigkeit scheint unter Singvögeln ein ganz universelles Merkmal zu sein (Kroodsma und Baylis, 1982; Marler, 1990; Marler und Nelson, 1992). Singvögel entwickeln ihr Gesangsrepertoire indem sie den Gesang von erwachsenen Vögeln nachahmen. Damit diese Gesangsentwicklung normal ablaufen kann, muß das Tier während seiner gesamten Entwicklungsphase ein vollständig intaktes Hörvermögen haben.

Im allgemeinen überlappt der Lebensraum verschiedener Arten, so daß es viele verschiedene Gesangsmuster zu hören gibt und sich somit die Frage stellt, wieso Singvögel typischerweise den für ihre Art charakteristischen Gesang erwerben und nicht den einer anderen Art. Mit dem Modell des „auditorischen Templates“ wird ein Mechanismus vorgeschlagen der das Erlernen artspezifischer Gesangsstrukturen steuert (Konishi, 1965a; Marler, 1970). Diesem Modell zufolge sind Singvögel angeborenermaßen mit einem auditorischen „Muster“ ausgestattet, das Aspekte ihres arteigenen Gesangs enthält. Hören die Tiere während der sensitiven Phase arteigenen Gesang, dann wird dadurch ein Lernprozeß aktiviert, der dafür sorgt, daß das Gesangsmuster eines Tutors im Gedächtnis abgespeichert wird, also eine Gedächtnisspur von dem Gesangsmuster gebildet wird (Marler und Peters, 1981; Marler, 1991). Für die Existenz eines solchen auditorischen Templates sprechen verschiedene Beobachtungen wie eine Prädisposition den arteigenen Gesang zu erwerben, der Verbleib von arterkennender Information im Gesang von gesangsdeprivierten Vögeln, sowie die stark verkümmerte Gesangsstruktur gehörloser Vögel im Vergleich zu den Gesängen gesangsdeprivierter Tiere (Konishi, 1965b; Marler und Sherman, 1983; Konishi, 1985). Wenn also ein Vogel ein auditorisches Template für den arteigenen Gesang besitzt, dann sollte dieses Muster für ihn wie ein Verstärker wirken, so daß ein Jungvogel eher dem Gesang der eigenen Art zuhört als Fremddgesängen zu lauschen. Eine solche verstärkende Wirkung des arteigenen Gesangs gegenüber artfremden Gesang wurde an verschiedenen Arten wie dem Buchfinken (*Fringilla coelebs*) (Stevenson, 1967), dem Kanarienvogel (*Serinus canaria*) (Calhoun et al., 1993) und dem Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) aufgezeigt (TenCate, 1991; Adret, 1993; Braaten and Reynolds, 1999).

Singvögel lassen sich im allgemeinen in ‘closed-ended learners’ und ‘open-ended learners’ unterscheiden. ‘Closed ended learners’ weisen im Adultzustand ein stereotypes Gesangsmuster auf, das nicht weiter verändert wird. Im Gegensatz dazu können ‘open-ended learners’ im Adultzustand ihr Gesangsmuster stark variieren und neue Gesangselemente dazulernen. Das Gesangslernen der ‘closed-ended learners’ ist also auf eine bestimmte frühe Entwicklungsphase beschränkt, wohingegen bei ‘open-ended learners’ auch noch im adulten Tier intensives Gesangslernen stattfinden kann. Bei den sogenannten ‘close-ended learners’ ging man davon aus, daß für den Erhalt des motorischen Gesangsmusters das Hörsystem nicht weiter erforderlich ist. Jedoch kann bei vielen dieser ‘close-ended learners’ sehr wohl Plastizität im allgemeinen Aufbau der Gesangsstruktur auch noch im erwachsenen Tier beobachtet werden. So kann bei dem ‘closed-ended learner’ wie dem Japanischen Mövchen (*Lonchura striata*), die Anzahl der Gesangselemente, sowie deren Abfolge im Gesangsverlauf von Gesang zu Gesang recht stark variieren, obwohl keine neuen Elemente ins Gesangsrepertoire hinzukommen und auch keine Gesangselemente im erwachsenen Tier verlorengehen (Okanoya, 1997). Daher ist anzunehmen, daß auch in diesen Arten mit auskristallisiertem Gesang für die Aufrechterhaltung der normalen Gesangsstruktur auditorische Rückkopplung notwendig ist.

1. 3. 2. Die Rolle der auditorischen Rückkopplung

Für eine normale Gesangsentwicklung ist ein intaktes Hörvermögen auf jeden Fall erforderlich, für die Aufrechterhaltung eines Gesangsmusters im adulten Tier allerdings nicht unbedingt. Wird ein Vogel noch vor der Auskristallisierung des Gesangs vertäubt, also noch bevor das Gesangsmuster in seiner endgültigen Form erlernt worden ist, so verkümmert seine bisher erworbene Gesangsstruktur und es entwickelt sich ein abnormaler Gesang (Konishi, 1964, 1965; Nottebohm, 1968; Marler and Waser, 1977; Marler and Sherman, 1983). Alle bisher untersuchten Singvogelarten benötigen akustische Erfahrung für ein erfolgreiches Gesangslernen. In erwachsenen Tieren ist allerdings die Bedeutung den eigenen selbst produzierten Gesang auch tatsächlich hören zu können bei verschiedenen Arten unterschiedlich ausgeprägt: so können z.B. Kanarienvögel ohne auditorische Rückkopplung ihren Gesang nicht mehr korrekt vortragen. Sie benötigen demnach auch nach der Geschlechtsreife ein intaktes Hörvermögen. Die Gesangsstruktur eines vollständig vertäubten erwachsenen Tieres verkümmert innerhalb von nur sieben Tagen (Nottebohm, 1976). Die

Gesangsstruktur eines im erwachsenen Alter vertäubten Tieres ist nach einem Jahr nicht mehr von derjenigen Gesangsstruktur zu unterscheiden, wo die Vertäubung bereits in frühester Jugend stattfand (Güttinger, 1981). Anders verhält es sich bei den Weißkopffammerfinken (*Zonotrichia leucophrys*) und den Buchfinken (*Fringilla coelebs*), für die auditorische Rückkopplung bei der Gesangsproduktion im adulten Tier nicht weiter notwendig ist: vertäubte erwachsene Tiere tragen auch noch zwei Jahre nach der Operation ihr Gesangsrepertoire unverändert vor (Konishi, 1965; Konishi and Nottebohm, 1969). Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) können nach Vertäubung ihren Gesang auch ohne auditorische Rückkopplung für einige Wochen weiterhin fehlerfrei vortragen (Price, 1979; Bottjer and Arnold, 1984). Da aber Effekte einer Vertäubung zu einem späteren Zeitpunkt nach ca. 16 Wochen sichtbar werden, ist letztendlich auch für den Zebrafinken ein intaktes Hörvermögen notwendig, um den Gesang auch weiterhin in vollendeter Form vortragen zu können (Nordeen und Nordeen, 1992a).

Kanarienvögel gehören zu den 'open-ended learners' und lernen Gesang nicht nur im ersten Lebensjahr, sondern auch noch in den Jahren danach, so daß neue Gesangselemente ältere ersetzen (Nottebohm and Nottebohm, 1978; 1986; Güttinger, 1979). Wegen dieser erweiterten Fähigkeit, Gesang auch noch im Adultzustand immer wieder neu erwerben zu können, ist das Vorhandensein eines stetigen akustischen Eingangs unbedingt erforderlich. Bei den 'closed ended learners' wie dem Weißkopffammerfink (*Zonotrichia leucophrys*), Buchfink (*Fringilla coelebs*), Mövchen (*Lonchura striata*) und Zebrafink (*Taeniopygia guttata*) findet das Gesangslernen nur in einer bestimmten Phase in der Jugendentwicklung statt und neue Elemente werden danach nicht weiter hinzugelernt. In diesen Arten, so nimmt man an, wird das während der sensiblen Phase gehörte und im Gedächtnis abgelegte auditorische Gesangsmuster anschließend in ein festes (statisches) motorisches Muster im erwachsenen Tier transformiert. Für adulte Tiere scheint es dann nicht mehr wichtig zu sein, ihr motorisches Gesangsmuster über auditorische Rückkopplung zu kontrollieren, was aber nicht für jeden bisher untersuchten closed-ended learner zutrifft (s. Zebrafink). Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß auch andere Faktoren als diejenigen, die sich aus den verschiedenen Lerntypen ergeben (open-ended vs. close-ended learners), die Rolle der auditorischen Rückkopplung bei der Gesangsproduktion in den verschiedenen Arten bestimmen. Kanarienvögel unterscheiden sich von anderen Singvogelarten nicht nur durch ihre Lernform (open-ended learners), sondern auch in der Darbietung ihres Gesangsmuster: die Anzahl

sowie auch die Aneinanderreihung (Sequenz) der Gesangselemente innerhalb eines Gesangsmusters ändert sich mit jeder Gesangsdarbietung. Im Gegensatz dazu sind die Gesänge von Weißkopffammerfink, Buchfink und Zebrafink recht kurz gestaltet und sehr stereotyp, so daß der Gesang eines Individuums immer gleich klingt, also für ein bestimmtes Tier immer identisch ist (die Gesänge verschiedener Individuen unterscheiden sich aber voneinander). Aus diesen Gründen ist anzunehmen, daß bei Singvögeln mit variablem Gesangsrepertoire wie dem Kanarienvogel die auditorische Rückkopplung insbesondere bei der Positionierung der Gesangselemente innerhalb eines Gesangsmusters eine wichtige Rolle spielt und somit die Effekte der Vertäubung aufgrund fehlender auditorischer Rückkopplung in bereits kürzester Zeit so markant auftreten. Inwiefern die Form des Gesangsmusters bei Buchfinken und Zebrafinken eine Bedeutung für die unterschiedlichen Effekte bei der Vertäubung spielen oder ob wiederum andere Faktoren eine Rolle spielen, ist noch nicht geklärt. Letztendlich sollten diese Unterschiede auf der Verhaltensebene sich in Unterschieden in den neuronalen Verschaltungen wiederfinden, was noch zu überprüfen wäre.

1. 3. 3. Das Gesangslernen bei Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*)

Das Gesangslernen läßt sich wie auch andere Lernvorgänge nicht auf einen einheitlichen globalen Vorgang zurückführen, sondern kann in mindestens drei Abschnitte unterteilt werden: 1) in die Akquisitionsphase, in der Information (Gesangsmuster eines Tutors) in zentrale Schaltungen codiert wird, wobei diese Schaltkreise auch Mikroschaltungen innerhalb einer Kernregion beinhalten können, 2) in die Speicherungsphase, während der die eingehende Information in den Schaltkreisen festgehalten wird und bei der Konsolidierung sich letztendlich in morphologisch erkennbare Veränderungen der Synapsenstruktur manifestiert und 3) in die Abrufphase, wo die Information abgerufen werden kann und eine Wahrnehmung (akustisches Erkennen eines Gesangsmuster) und eine daraus folgende Handlung (motorische Gesangsaktivität bei Männchen) einleitet (modifiziert nach Shepherd, 1993). Diese für Gedächtnisbildungsprozesse aufgestellten neuronalen Mechanismen lassen sich auch auf das Gesangslernen übertragen und werden auch in entsprechender Abfolge auf der Verhaltensebene postuliert (Marler, 1997).

Bei den meisten Singvogelarten, wie auch dem Zebrafinken, singen ausschließlich die Männchen. Die Jungtiere lernen ihren Gesang, indem sie ihr eigenes Vokalisationsmuster über auditorische Rückkopplung an ein im Gehirn gelerntes Muster (auditory template =

Gesang des Vaters) anzupassen versuchen. Das Gesangslernen beim Zebrafinken, vereinfacht in zwei Phasen dargestellt, beinhaltet: (1) die sensorische Lernphase, während der durch das Hören akustischer Vorbilder die Aufnahme eines Gesangstyps und die Festlegung desselben im ZNS in Form eines Sollmusters erfolgt und (2) die Gesangsentwicklungsphase, also die sensomotorische Phase, die durch die motorische Einübung des Gesangs gekennzeichnet ist (Abb. 1). Beim Zebrafinken läßt sich die erste Phase ("template formation") für die Zeit zwischen dem ca. 20. und 35. Tag eingrenzen (Böhner, 1990). Das Ende dieser Phase kann unter bestimmten Umständen weit über die normale zeitliche Begrenzung hinausgehen (bis nach der Geschlechtsreife: s. Morrison und Nottebohm, 1993). Unter experimentellen Bedingungen, wenn z.B. während der Gedächtnisbildungsphase für Gesang ein anderer neuer Tutor angeboten wird oder der Tutorgesang erst viel später zur Verfügung gestellt wird, dann kann die sensorische Phase um viele Wochen verlängert werden (Clayton, 1987; Eales, 1985;

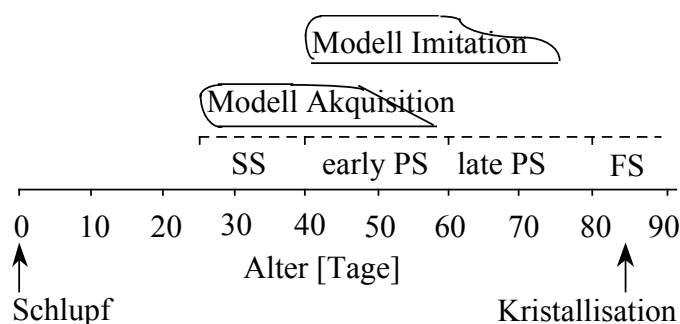


Abb. 1: Schematische Darstellung des Gesangslernens bei Zebrafinken. In der sensorischen Phase wird ein Gesangsmuster über den auditorischen Eingang im Gedächtnis abgelegt. In der sensomotorischen Phase versucht das Tier seine eigene anfangs noch sehr unreife Gesangsstruktur (früher plastischer Gesang) dem im Gedächtnis abgespeicherten Modell anzugleichen. Die Gesangsentwicklungsphase endet mit dem Eintritt der sexuellen Reife in einem auskristallisierten Gesangsmuster. (modifiziert nach Nottebohm, 1993)

Slater et al., 1993; Morrison and Nottebohm, 1993; Jones et al., 1996). Bereits in der Gedächtnisbildungsphase sind andeutungsweise im Jugendgesang der Männchen unstrukturierte Gesangelemente zu erkennen, die den „Subsong“ (SS) bilden. Die sensomotorische Phase, das eigentliche Einüben des Gesangsmusters, beginnt beim Zebrafinken zwischen dem 30. und 40. Tag mit dem frühen plastischen Gesang (PS), der um den 60. Tag in den späten plastischen Gesang übergeht (Abb. 1). Die sensomotorische Phase endet um den 80. Tag mit der Auskristallisation des Gesangsmusters, kann aber auch bei

einigen Individuen bis zum ca. 100. Tag andauern (Immelmann, 1969; Böhner, 1990; Nottebohm, 1993). Das bedeutet, daß ein Zebrafinkenmännchen bis zur Geschlechtsreife damit beschäftigt ist seinen Gesang in eine solche Form zu bringen, daß sie der im Gedächtnis abgespeicherten Form entspricht.

Eine Vielzahl von Untersuchungen behandelt die Frage nach den Voraussetzungen und den notwendigen Bedingungen für diesen Lernprozess (e.g. Jones et al., 1996). Bei diesem Lernprozess handelt es sich um den Erwerb eines komplexen motorischen Musters, die Gesangsstruktur, die kurz vorgestellt werden soll. Die kleinste Einheit eines Gesangsmusters ist das Element, definiert als durchgehende Schwärzung auf einem Sonagramm, die kohärent ist in der Zeit (Sossinka und Böhner, 1980). Das Element wird von verschiedenen Autoren auch Ton oder Silbe genannt (Price, 1979; Zann, 1993). Elemente sind durch Pausen getrennt (Abb. 2). Eine Aneinanderreihung von verschiedenen Elementen (einschließlich der Pausen) wird Motiv genannt (oder auch „song phrase“). Ein fertiges (auskristallisiertes) Gesangsmuster kennzeichnet sich vor allem durch die starre Abfolge der Elemente innerhalb des Motivs aus. In der Abbildung 2 ist ein kurzer Ausschnitt aus einem Gesangsmuster in Form eines Sonagramms dargestellt. Die einzelnen Elemente sind exemplarisch mit Nummern markiert, i steht für Einleitungselement (introductory note). Im allgemeinen werden bei der Gesangsdarbietung mehrere Motive hintereinander weg gesungen. Die Aneinanderreihung von Motiven wiederum wird Strophe genannt. Der Gesang beginnt immer mit einem spezifischen Element, dem Einleitungselement, das in einer kurzen Sequenz dem einleitenden Motiv vorangestellt wird. Das Einleitungselement kann auch leicht abgeändert im Motiv selbst erscheinen oder innerhalb einer Strophe zwischen zwei Motivabfolgen stehen. Dauert eine Pause zwischen zwei Elementen länger als 2 Sekunden, kennzeichnet das den Beginn einer neuen Strophe. Zebrafinken haben im allgemeinen 6 oder 7 Elemente in ihrem Motiv eingebaut. Die Motivlänge wiederum ist artspezifisch und liegt bei allen Zebrafinken zwischen 700 und 800 msec (Sossinka and Böhner, 1980). Durch die starre Abfolge der Elemente im Motiv und die konstante Aneinanderreihung von Motiven bei der Gesangsdarbietung hören sich für den Beobachter Zebrafinkengesänge alle recht ähnlich an. Der Gesang eines Zebrafinken ist aber ganz individuell und unterscheidet sich eindeutig von dem seines Nachbarn, insbesondere durch den Aufbau und die Anzahl der Elemente im Motiv. Während der gesamten Jugendentwicklung wird dieses komplexe motorische Muster Schritt für Schritt eingeübt. Während der motorischen Gesangsentwicklung werden erst die

Elemente über einen langen Zeitraum in ihrer endgültigen Form eingeübt und dann erst wird die stereotype Anordnung der Elemente im Motiv erworben, wobei die Kopiergenauigkeit des Gesangs von der Gesangsaktivität unabhängig ist (Böhner 1991, 1993).

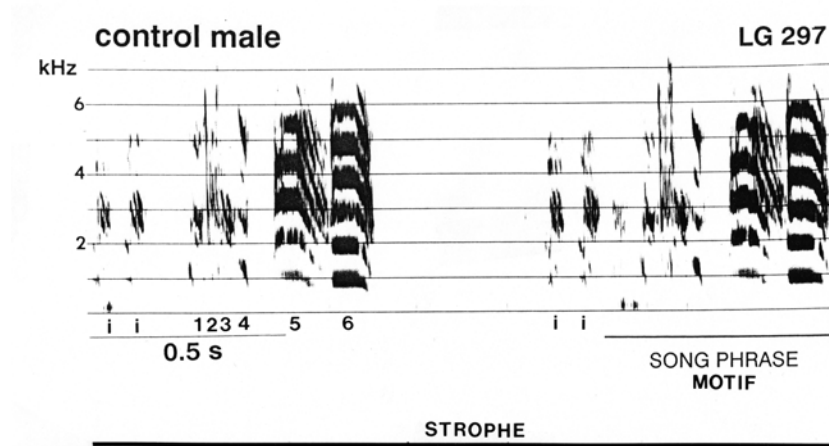


Abb. 2: Ausschnitt aus dem Gesangsmuster eines adulten Zebrafinkenmännchens, dargestellt in Form eines Sonagramms. Das Gesangsmuster baut sich aus Elementen auf, wobei unter einem Element (element, syllable, note) ein kontinuierlicher Ton verstanden wird, der sich durch Pausen von anderen unterscheidet. Zebrafinkengesang beginnt immer mit einer kurzen Folge von Einleitungselementen (i introductory notes). Dann folgt eine Sequenz von verschiedenen strukturierten Elementen, die immer in der gleichen Anordnung gesungen werden und in der Abbildung mit Zahlen wiedergegeben sind. Eine solche Sequenz wird Motiv (motif, song phrase) genannt. Im allgemeinen werden mehrere Motive hintereinander weg gesungen, die dann eine Strophe bilden. Jedes Zebrafinkenmännchen besitzt sein eigenes individuelles Gesangsmuster, das sich durch die Form und die Anzahl der gesungenen Elemente von anderen Zebrafinkengesängen unterscheidet.

(modifiziert nach Korsia und Bottjer, 1991)

Im allgemeinen versteht man unter dem Begriff ‘Gesangslernen’ den Erwerb eines motorischen Gesangsmusters, also die Fähigkeit einen Gesang dann auch selber vortragen zu können. Dieser Lernprozeß beinhaltet immer zuerst ein sensorisches Lernen, wobei der Vogel sich ein Gesangsmuster einprägen muß. Zebrafinkenweibchen singen zwar nicht, erlernen aber auch ihr arteigenes Gesangsmuster, denn bei der Partnerwahl sind sie sehr wohl in der Lage, einen Zebrafinkengesang von artfremden Gesang unterscheiden zu können (Miller, 1979; Cynx, 1993). Da also Zebrafinkenweibchen selber nicht singen, findet bei ihnen demnach lediglich die sensorische Phase des Gesangslernens statt, nicht aber die sensomotorische. Der Balzgesang wird ausschließlich von Männchen vorgetragen und die Weibchen wählen sich ihren Geschlechtspartner entsprechend seiner Gesangsdarbietung aus.

Dabei zeigen die Weibchen eine Präferenz für den Gesang eines Männchens, zu dem sie enge verwandtschaftliche Beziehungen haben (Miller, 1979). Zebrafinkenweibchen sind in der Lage, sehr feine Unterschiede in einer Gesangsstruktur zu unterscheiden. Cynx et al., (1990) konnten durch operante Konditionierung nachweisen, daß sie in einer dargebotenen Silbe (die sich aus einer Grundfrequenz und ihren Harmonischen zusammensetzt), eine einzelne fehlende Harmonische dieser Silbe erkennen können. Welche neuronalen Strukturen für diese Fähigkeiten verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt.

1. 3. 4. Neuronale Verschaltungen des Gesangssystems

Vögel besitzen neuronale Zentren, die sich auf das Gesangslernen und die Gesangsproduktion spezialisiert haben (Nottebohm, 1993). Die Verschaltungen dieser Gehirnregionen bilden die Voraussetzungen für den Gesangserwerb und für die Aufrechterhaltung erworbener Gesangsmuster und weisen interessante Parallelen zu Säugern auf (Reiner et al., 1983; Karten, 1991; Wild, 1997; Iyengar et al., 1999). Singvögel haben für Gesang ähnlich wie der Mensch für Sprache, im Laufe der Phylogenese ein telencephales Kontrollsystem für die Produktion gelernter Vokalisation entwickelt (Wild, 1997). Die sogenannte 'motorische Bahn' des Gesangssystems projiziert auf Mittelhirnregionen und Hirnstammareale, die wiederum die Muskelaktivität des Syrinx und der Atmung kontrollieren. Die prämotorische Bahn wurde erstmals von Nottebohm et al. (1976) beschrieben. Ihre Hauptkomponenten bestehen aus dem im caudalen Bereich des Telencephalons liegenden HVC (high vocal center; früher Hyperstriatum ventrale, pars caudalis genannt), der eine direkte Verbindung zum Nucleus Robustus archistriatalis (RA) macht, und dem im Hirnstamm liegenden N. hypoglossus tracheosyringealis (N. XIIIts), der mit seinen Neuronen die Syrinxmuskulatur innerviert (Abb. 3). Da der HVC nicht Teil des Hyperstriatums ist, wie ursprünglich angenommen (Nottebohm et al., 1976), sondern als Teil des dorsalen caudalen Neostriatums identifiziert wurde (Nottebohm, 1987; zitiert in Margoliash et al., 1994), wird inzwischen oftmals nur noch das Akronym HVC von vielen Autoren verwendet. Zur prämotorischen Bahn gehört ebenso der N. Uvaeformis (Uva) im Thalamus und der N. Interfacialis im Telencephalon (Nif) - beide Kernregionen projizieren in den HVC (Nottebohm et al., 1982; McCasland, 1987; Williams, 1985, 1989; Williams und Vicario, 1993).

Neben der direkten Verbindung von HVC nach RA gibt es eine weitere indirekte Bahn, die auch HVC mit RA verbindet, aber dabei über die Basalganglien und den Thalamus

führt (Bottjer et al., 1989; Okuhata und Saito, 1987). Diese zweite Bahn wird anteriore Vorderhirnschleife genannt (AFP = anterior forebrain pathway). Sie führt vom HVC über die dem Striatum ähnelnde area X, die mediale Region des dorsolateralen thalamischen Nucleus (DLM) und weiter über eine Vorderhirnregion, die sehr wahrscheinlich dem Präfrontalen Cortex analog ist: der laterale magnocelluläre Nucleus des anterioren Neostriatum (LMAN) (Okuhata and Saito, 1987; Bottjer et al., 1989; Williams, 1989). Neben diesen beiden Pro-

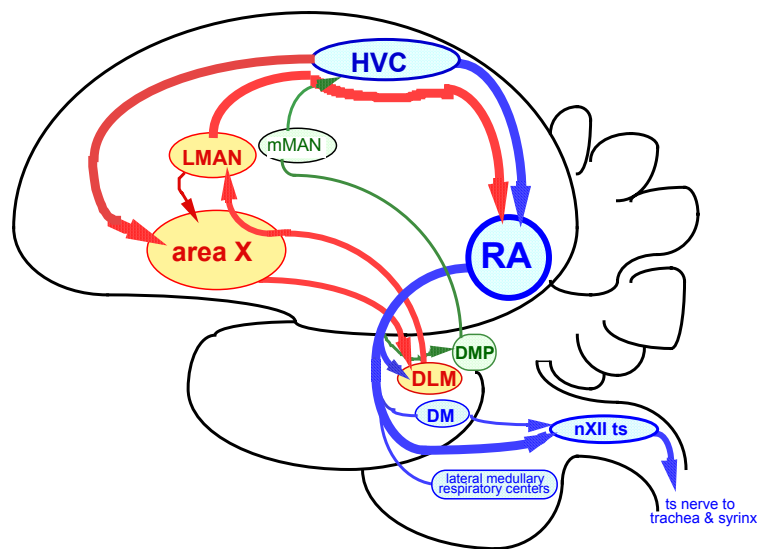


Abb. 3: Schematische Darstellung der neuronalen Verschaltung im Gesangssystem. In der motorischen Bahn (dunkel schraffiert) projiziert der HVC zum Nucleus robustus archistriatalis (RA), der wiederum seine Axone zum Hypoglossusnucleus sendet (nXII ts). In der anterioren Vorderhirnschleife (hell schraffiert) verläuft die Information vom HVC zur area X im Lobus olfactorius (area X), von dort in den anterioren Thalamus zum DLM (N. dorsolateralis thalami), der seine Axone zum LMAN (N. lateralis magnocellularis des anterioren Neostriatum) sendet, von wo die Information in den RA gelangt. Daher erhält der RA eine direkte Projektion vom HVC, sowie auch eine indirekte Projektion über die anteriore Vorderhirnschleife. Der HVC erhält ferner Information vom RA, über den posterioren Teil des dorsomedialen thalamischen Nucleus (DMP), der seine Information zum magnocellulären Nucleus des anterioren neostriatum (mMAN) schickt, der wiederum zum HVC projiziert.

jektionssystemen (prämotorische Bahn und AFP) gibt es noch eine Vielzahl von Kernregionen, die direkt und/oder indirekt in das neuronale Netzwerk des Gesangssystems eingebunden sind. Die afferenten und efferenten Projektionen dieser Kernregionen sind bei weitem noch nicht vollständig geklärt. Der RA projiziert nicht nur zum nXII ts, sondern auch

massiv zu den respiratorischen Kernen in der Medulla, dem N. Ambigualis (AM) und N. Retroambigualis (RAm) (Vicario, 1993; Wild, 1993a,b), sowie auch zu zwei weiteren thalamischen Nuklei, dem posterioren Teil des dorsomedialen thalamischen Nukleus (DMP) und dem medialen Teil des dorsolateralen thalamischen Nukleus (DLM) (Wild, 1993a; Vates et al., 1997). RA-DLM-Projektionsneurone greifen somit wiederum in den Schaltkreis der anterioren Vorderhirnbahn ein. Zur AFP und der prämotorischen Bahn gibt es ein drittes Projektionssystem, welches bereits verarbeitete motorische Information aus dem RA über den thalamischen Nukleus DMP in das Telencephalon wieder einspeist (Abb. 3). Es handelt sich hierbei um die Projektion vom RA zum DMP und von hier zum medialen Teil des lateralen magnocellulären Nukleus des anterioren Neostriatum (mMAN), der wiederum in den HVC projiziert. Innerhalb dieses Schaltkreises kann auch über den DMP zum ipsilateralen und kontralateralen mMAN zu einem geringen Ausmaß interhemisphärische Kommunikation stattfinden (Vates et al., 1997; Foster et al., 1997).

Auf der Ebene des Telencephalons sind für die Gesangskerne keine direkten Verbindungen zwischen den beiden Hemisphären bekannt. Andererseits ist der HVC für die Mustergenerierung der Gesangsstruktur direkt verantwortlich (Vu et al., 1994), so daß sich die Frage stellt, inwiefern eine Kommunikation zwischen den beiden Hemisphären stattfindet, die letztendlich beim Singen für eine wohlkoordinierte Synchronisation der Syrinxmuskeln sorgt (Suthers, 1990). Eine bilaterale Rückkopplungsschleife ins Vorderhirn, die theoretisch seit langem gefordert wird, wurde aufgrund der Konnektivität der rostralen ventrolateralen Medulla (RVL) identifiziert. Die RVL erhält Afferenzen vom N. dorsomedialis (DM), ein Bereich innerhalb des N. intercollicularis (ICO). Der DM wiederum wird vom RA innerviert. Da RVL seine Information sowohl zum ipsi- als auch zum kontralateralen Nucleus Uva schickt, wird somit über den RA eine bilaterale Rückkopplung innerhalb des motorischen Netzwerks für die Gesangskontrolle gewährleistet (Striedter und Vu, 1998). Uva wird aufgrund seiner Lage im caudalen Bereich des posterioren thalamischen Nucleus auch cDLP genannt und ist Ausgangspunkt der prämotorischen Bahn. Die neueren Befunde von multiplen zum Teil geschlossenen Schleifen, wie sie vor allem an Zebrafinken nachgewiesen wurden, bestätigen, daß das bisherige Konzept des Gesangslernens und der Gesangsproduktion als seriell und in Reihe geschalteter Gesangskerne nicht weiter aufrecht gehalten werden kann, sondern durch parallel ablaufende Verarbeitungsmechanismen, wie man sie auch aus anderen Systemen bei Säugern kennt, ersetzt werden muß.

Noch weitgehend unbekannt sind die Verbindungen bei Weibchen, insbesondere bei den Tierarten, bei denen nur die Männchen singen und die Weibchen nicht, wie z.B. dem Zebrafinken. Im erwachsenen Tier sind die Gesangskerne der Weibchen im allgemeinen nur noch rudimentär vorhanden, im juvenilen Tier unterscheiden sie sich aber kaum in ihrer neuronalen Struktur von denen der Männchen. Daher könnten in juvenilen Weibchen auch entsprechende Verbindungen wie bei Männchen vorhanden sein, die dann später wieder abgebaut werden. Lange nahm man an, daß bestimmte Projektionen wie die Verbindung vom HVC zum RA beim Weibchen fehlen. Konishi and Akutagawa (1985) haben anhand radioaktiver Markierungssubstanzen gezeigt, daß in Zebrafinkenweibchen HVC-Axone den RA nicht innervieren, sondern an ihm vorbeiziehen. Neuere Befunde ermittelt mit elektrophysiologischen Methoden in Kombination mit Optical Imaging belegen aber, daß der RA bei Zebrafinkenweibchen doch vom HVC innerviert wird, wenn auch das Innervationsmuster und die Übertragungseigenschaften beim Weibchen sich von denen der Männchen unterscheidet (Wang et al., 1999). In adulten Zebrafinken kann im Lobus olfactorius bei Weibchen keine area X identifiziert werden, weder anhand von Nissl-Färbungen, noch durch andere histochemische Marker (Kirn und DeVoogd, 1989; Bottjer, 1993; Grisham und Arnold, 1994; Wallhäußer-Franke et al., 1995). Allerdings können Fasern aus dem HVC bei Weibchen in eine der area X äquivalenten Region im Lobus parolfactorius beobachtet werden (Simpson und Vicario, 1991a; Herrmann und Arnold, 1991a; Nordeen und Nordeen, 1988). Weitere Untersuchungen zum Projektionsmusters der Gesangsregionen, wie sie bei Männchen beschrieben sind, müssen bei Weibchen noch durchgeführt werden, um anhand der neuronalen Verschaltungen die Rolle des Gesangssystems bei Weibchen besser verstehen zu können.

1. 3. 5. Funktionelle Bedeutung spezifischer Kernregionen im Gesangssystem

Anhand von Läsionsstudien wurde die zentrale Bedeutung der Gesangskerne HVC und RA für den Gesangserwerb und für die Aufrechterhaltung der Gesangsstruktur aufgezeigt: Verletzungen von HVC oder RA in juvenilen wie auch in adulten Tieren stören erheblich den motorischen wohlkoordinierten Ablauf beim Singen (Nottebohm et al., 1976, 1982; Simpson und Vicario, 1990). Bei vollständiger Läsion kommt es zu einem völligen Wegfall von Gesangselementen und die Tiere verstummen vollends. Der HVC und seine Afferenzen Nif und Uva, sowie auch der RA und der nXIIts enthalten Neurone, die während des Singens

aktiv sind (McCasland und Konishi, 1981; McCasland, 1987; Margoliash, 1986; Williams und Vicario, 1993; Yu und Margoliash, 1996). Chronische Ableitungen zeigen, daß die prämotorische Bahn, einschließlich Nif und Uva, an der unmittelbaren Kontrolle der Gesangsproduktion beteiligt ist (McCasland, 1987; Williams und Vicario, 1993; Vu et al., 1994; Yu und Margoliash, 1996; Theunissen und Doupe, 1998; Janata und Margoliash, 1999). Kurz vor dem eigentlichen Gesangsbeginn kann bereits neuronale Aktivität in Nif gemessen werden; Aktivitäten in HVC, RA und nXIIIts folgen in zeitlicher Reihenfolge (Williams, 1985; McCasland, 1987). Fast alle Neurone telencephaler Gesangszentren sind auditorisch. Bei der Suche nach einem auditorischen Eingang in das Gesangssystem konnten direkte und indirekte Eingänge aus den Vorderhirnstrukturen des Feld L zur Shelf-Region des HVCs, sowie zur unmittelbar rostral gelegenen dorsalen Region des RAs identifiziert werden (Kelly und Nottebohm, 1979; Fortune und Margoliash, 1995; Vates et al., 1996; Mello et al., 1998). Interessanterweise sind die meisten Neurone im HVC nicht nur auditorisch, sondern antworten bevorzugt auf komplexe Gesangsstrukturen, vor allem auf den eigenen Gesang (Katz und Gurney, 1981; McCasland, 1987; Margoliash und Fortune, 1992; Lewicke und Konishi, 1995; Theunissen und Doupe, 1998). Im Vergleich zum eigenen Gesang ist die neuronale Antwort auf andere artspezifische Gesänge oder auf den eigenen, aber rückwärts vorgespielten Gesang, nur gering. Diese neuronale Selektivität ist in juvenilen Tieren noch nicht ausgebildet, sondern wird während der Gesangsentwicklung erworben (Volman, 1993) und auf die Zielgebiete des HVCs, also die area X und den RA übertragen (Doupe und Konishi 1991; Vicario und Yohai, 1993). Stimulationsexperimente zeigen, daß der HVC für die präzise zeitliche Abfolge der Gesangselemente verantwortlich ist und als Mustergenerator angesehen werden kann. Werden im HVC Mikrostimulationen während des Singens ausgelöst, so wird der Gesang unmittelbar unterbrochen und das Tier beginnt mit einer neuen Strophe (Vu et al., 1994). Werden solche Mikrostimulationen während des Singens im RA durchgeführt, so kommt es nicht zu einem Abbruch und Neuanfang einer Strophe, sondern lediglich zu einer Störung innerhalb der Strophe, so daß die akustische Struktur einer einzelnen Silbe betroffen ist. Die Aktivitätsmuster extrazellulärer Ableitungen im HVC korrelieren extrem gut mit der zeitlichen Abfolge von Silben und Pausen innerhalb der Gesangsstruktur (=Motiv), wohingegen im RA die Feuerrate von Neuronen eindeutig mit der Silbenstruktur korreliert, nicht aber mit dem Motiv (Yu und Margoliash, 1996). Aufgrund dieser Befunde ist der HVC sehr wahrscheinlich der Ort, wo die Reihenfolge der Silben

abgelegt ist. Die akustische Struktur einzelner Silben sollte demzufolge im RA abgespeichert sein.

Ist die prämotorische Bahn für die präzise Ausführung der Gesangsstruktur verantwortlich, so wird der AFP vor allem beim Gesanglernen eine wichtige Rolle zugeordnet. Läsionen oder pharmakologische Inaktivierung von Kernregionen der AFP (area X, LMAN und DLM) in juvenilen Tieren beeinflussen erheblich das Gesanglernen, sowie auch das motorische Muster. Im Gegensatz dazu, haben die gleichen Eingriffe auf die AFP in erwachsenen Tiere, die bereits ein auskristallisiertes Gesangsmuster aufweisen, keinen oder nur sehr geringen Einfluß auf die Aufrechterhaltung der Gesangsstruktur, sowie auf die Gesangsaktivität (Bottjer et al., 1984; Sohrabji et al., 1990; Basham et al., 1996; Scharff et al., 1991, 1998). Eine Studie von Williams und Mehta (1999), in der sowohl bilateral der LMAN als auch der nXIIIts läsiert werden, zeigt allerdings, daß eine der Kernregionen der AFP, der LMAN, in adulten Tieren sehr wahrscheinlich doch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gesangsstruktur spielt. Läsionen des n. XIIIts in adulten Männchen beeinflussen das stereotypen Gesangsmuster (Williams und McKibben, 1992). Diese Gesangsplastizität ist nicht mehr vorhanden, wenn zusätzlich auch noch bilateral der LMAN läsiert wird. Doya und Sejnowski (1995) vermuten, daß die Speicherung eines Gesangsmusters in einzelnen Kernregionen der AFP selbst stattfindet und daß beides, ein Anpassungsmechanismus wie auch ein Abspeicherungsmechanismus (“template formation“) für das Gesanglernen, gemeinsam in der area X vorhanden sein sollte. Sie vermuten diesen Mechanismus in der area X, da diese Region dopaminergen Eingang aus dem Mittelhirn enthält (Bottjer, 1993). Aktivität dopaminergere Systeme werden in vielen Arten mit Belohnung in Zusammenhang gebracht (Schultz et al., 1993; Wynne und Güntürkün, 1995). So könnte aufgrund von Belohnung auditorisches Lernen in der area X selektiv gesteuert werden, d.h. der Zeitpunkt, wann etwas gelernt wird, wird über die Aktivität des dopaminergen Eingangs genau vorgegeben. Auditorische Information erhält die area X wiederum vom HVC, so daß durch die zeitgleiche Aktivität beider Eingänge das Gesangsmuster in area X-Neuronen abgelegt werden kann. Bestimmte auditorische Signale des Gesangsmusters werden somit selektiv in Form eines Gedächtnisses in der area X abgespeichert. Diese Information könnte dann wiederum über den Thalamus (DLM) in den LMAN eingespeist werden. In adulten Tieren antworten Neurone im HVC, in der area X, sowie im LMAN selektiv auf den eigenen Gesang und diese neuronale Selektivität muß

während der Gesangsentwicklung erworben werden (Volman, 1993; Solis und Doupe, 1997; Doupe, 1993, 1997). Nach Doya und Sejnowski (2000) soll während der Gesangsentwicklung die (sich entwickelnde) neuronale Selektivität auditorischer Neurone im HVC lediglich auditorische Erfahrung widerspiegeln, wohingegen die neuronale Selektivität der area X-Neurone auf das spezifische Gesangsmuster abgestimmt ist, was noch erlernt werden muß. Tatsächlich wurden in der area X solche Neurone gefunden, die auf den Tutorgesang antworten, wie auch solche, die selektiv auf den eigenen Gesang antworten (Solis und Doupe, 1997). Doupe und Konishi (1991) postulieren für die AFP einen entwicklungsabhängigen Mechanismus mit dem die Güte der eigenen Vokalisation mit dem abgespeicherten Gesangsmuster verglichen wird. Da auch adulte Zebrafinken zur Aufrechterhaltung ihrer Gesangsstruktur ihren eigenen Gesang hören müssen (Nordeen und Nordeen, 1992a), wird in der AFP ein wichtiger Kontrollmechanismus für die Evaluierung auditorische Rückkopplung gesehen (Doupe et al., 2000). Elektrophysiologische Daten neuronaler Aktivitätsmuster in der AFP (area X und LMAN), die an singenden Vögeln ermittelt wurden, sowie auch an narkotisierten Tieren durch Vorspielen des eigenen Gesangs, lassen vermuten, daß in der AFP sehr wahrscheinlich eine Efferenzkopie prämotorischer Signale vom HVC abgebildet ist und aufgrund dieser Aktivität wiederum modulierenden Einfluß auf die prämotorische Bahn ausgeübt wird (Doupe et al., 2000; Solis und Doupe, 2000).

1. 4. Die Fragestellung: Neuronale Korrelate des Gesangslernens bei Zebrafinken.

Eine der wohl spannendsten Fragen, die wir an das Gesangssystem stellen können, ist die Frage, ‘Wo’ und ‘Wie’ ein Gesangsmuster neuronal repräsentiert wird. Welche Gehirnareale sind an der Gedächtnisbildung für eine Gesangsstruktur beteiligt und wie sehen die neuronalen Korrelate für das Gesangslernen aus? Mein besonderes Interesse liegt vor allem in der strukturellen Analyse neuronaler Korrelate des Gesangslernens. Aus der Säugetierliteratur wissen wir, daß Gedächtnis nicht nur im Gehirn vielfach repräsentiert ist, wie es bereits von Hebb (1949) postuliert wurde, sondern vor allem in den Regionen lokalisiert sein sollte, die an den spezifischen Verarbeitungsprozessen der Gedächtnisleistung beteiligt sind, also cerebralen corticale Arealen wie Assoziationsareale und polymodale Regionen (Übersicht in Markowitsch, 2000). Subcorticale und allocorticale Strukturen, insbesondere das limbische System, spielen wiederum bei der Motivation zur Gedächtnisbildung eine besondere Rolle. Auf das Gesangssystem übertragen, bedeutet das, daß auch das Gesangslernen in Form eines

Gedächtnis zentral mehrfach repräsentiert sein sollte und daß auch Gesangslernen über Motivationssysteme gesteuert sein sollte. Informationsverarbeitung und Speicherung ist ein aktiver, komplexer Prozess, der sowohl über Umweltreize stimuliert wird, als auch intern vom Gehirn selbst erzeugt werden kann. Im allgemeinen wird die Information von den peripher liegenden Organen über subcorticale Kernregionen zu Cortexarealen transferiert. In verschiedenen Tierexperimenten konnte gezeigt werden, daß bei der Ausbildung eines Gedächtnisses mit den bioelektrischen Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen auch Veränderungen in der morphologischen Struktur von Neuronen einhergehen. Diese Veränderungen finden vor allem in der neuronalen Konnektivität und der synaptischen Feinstruktur statt und stellen letztendlich das morphologische Substrat für Gedächtnis dar (Shepherd, 1993).

Auch für das Gesangssystem sollten dementsprechend Gedächtnisleistungen bzgl. des Gesangslernens in der Feinstruktur von Neuronen, sowie ihrer Konnektivität repräsentiert sein. Welche Kernregionen könnten beim Vogel dafür in Betracht gezogen werden? Aufgrund von Läsionsstudien, sowie anatomischen Verbindungen von geschlossenen Schleifen, wie sie auch bei den Basalganglien bei Säugern charakteristisch sind, könnte die anteriore Vorderhirnbahn ein solches neuronales Korrelat repräsentieren (s. auch 1. 3. 5.; Bottjer et al., 1984; Doya und Sejnowski, 2000). Im Vergleich zum Säuger stellt die area X eine striatale Region, der DLM eine thalamische und der LMAN eine corticale Region dar (Bottjer und Johnson, 1997). Für das Gesangssystem der Vögel sollten daher die Gesangskerne der AFP selbst, deren Konnektivität untereinander, sowie an das Gesangssystem assoziierte Gehirnregionen bei der Ausbildung eines Gedächtnisses maßgeblich verantwortlich sein. Seit langem ist bekannt, daß beim Zebrafinken nur die Männchen singen und daß mit diesem Sexualdimorphismus auf der Verhaltensebene auch ein Sexualdimorphismus auf neuronaler Ebene einhergeht. Die Fähigkeit ein komplexes motorisches Programm (Gesang) einzuüben und dieses Verhalten in Form von wohlkoordinierten Muskelbewegungen zu definierten Zeitpunkten, gekoppelt an weitere Faktoren wie dem Motivationszustand, auszuführen, ist bei Zebrafinken nur den Männchen möglich. Bei dem Gesangsverhalten handelt es sich also um ein sexualdimorphes Verhalten und dieser Sexualdimorphismus spiegelt sich auch neuronal in den an diesem Verhalten beteiligten Gehirnregionen wieder.

Daher stellt sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung erhalten die Gesangskerne beim Zebrafinken ihre charakteristische sexualdimorphe Ausprägung? Sind die

Gehirnregionen bereits vor dem Gesangslernen sexualdimorph oder findet die sexuelle Differenzierung erst zu einem späteren Zeitpunkt in der sensorischen bzw. in der sensomotorischen Phase statt? Weibchen singen zwar nicht, aber sie erwerben auch in früher Jugend ein Gesangsmuster, das sie im Gedächtnis abspeichern (Miller, 1979). Daher könnte die Beantwortung der Frage nach dem Zeitpunkt der sexuellen Differenzierung der Gesangskerne Aufschluß über die Beteiligung von Gesangskernen bei der Gedächtnisbildung von Gesangsstrukturen bei Weibchen liefern. Da die Gesangskerne HVC und RA in adulten Weibchen weitaus kleiner sind als in adulten Männchen und die area X bei Weibchen überhaupt nicht zu sehen ist (Nottebohm und Arnold, 1976), stellte sich mir die Frage, ob dieser Befund generell auch auf andere Kernregionen des Gesangssystems zutrifft und zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung sich letztendlich Unterschiede in der Volumengröße herauskristallisieren? Die Antwort zu diesen Fragen habe ich in Kapitel 2, Abschnitt 2. 1. zusammengefaßt.

Der LMAN der AFP spielt beim Gesangserwerb bei Männchen eine besondere Rolle (Bottjer et al., 1984). Daher haben wir unsere Untersuchungen zur Feinstruktur struktureller Korrelate des Gesangslernens auf diese Gehirnregion konzentriert und in einer detaillierten Entwicklungsstudie anhand verschiedener Parameter mit unterschiedlichen Methoden die neuronale Struktur des LMAN quantitativ erfaßt. Dabei sind wir der Frage nachgegangen, ob und in welchem Ausmaß beim Zebrafinken zwischen den neuronalen Entwicklungsprozessen dieser Gehirnregion und den unterschiedlichen Stadien des Gesangslernens auf der Verhaltensebene ein Zusammenhang aufgezeigt werden kann. In Kapitel 2, Abschnitt 2. 2. werden die Ergebnisse zur cytomorphologischen quantitativen Charakterisierung des LMAN im einzelnen vorgestellt. Der Abschnitt beginnt nach einer kurzen Einführung mit der Darstellung der Entwicklung dendritischer Spines, einer Studie, die ich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Wallhäuser-Franke und Prof. DeVoogd am Golgi-Cox Präparat durchgeführt habe und die erstmals die morphologische Struktur von Neuronen im LMAN vor, während und nach dem Gesangslernen analysiert. Mit meinen elektronenmikroskopischen Befunden wird ein erster Einblick in die synaptische Struktur des LMAN in juvenilen und adulten Tieren gegeben. Dabei konnte ich zu dem von uns aufgezeigten regressiven Entwicklungsverlauf dendritischer Spines auch Veränderungen in der Synapsendichte, sowie der synaptischen Feinstruktur nachweisen. Ein weiterer Punkt der cytomorphologischen Charakterisierung des LMAN beschäftigte sich mit der Entwicklung neuronaler Somata, ging

man doch bisher davon aus, daß sich die Zellkörper im LMAN während des Gesangslernens nicht verändern (Bottjer et al., 1985). Da aber unsere Befunde über die Entwicklung dendritischer Spines massive Veränderungen aufzeigten und Literaturdaten über Zellsomata nur unzureichend vorlagen, bin ich der Frage nach dem Zellgrößenwachstum im einzelnen nachgegangen. Aufgrund meiner Ergebnisse ergab sich die Frage, ob mit den von mir nachgewiesenen Veränderungen in der Zellgröße auch Veränderungen in der Neuronendichte auftreten. In einer weiteren Fragestellung sollte die Hypothese überprüft werden, ob der auf der zellulären Ebene nachgewiesene Sexualdimorphismus sich auch auf der Ebene von Nucleoli widerspiegelt, ein Bereich, der bisher völlig vernachlässigt wurde. Im Zusammenhang mit den Nucleoli interessierte ich mich auch für die Lage der Nucleoli im Nucleus (Ekzentrizität), können doch aufgrund der Orientierung des Nucleolus im Nucleus Aussagen zur Zellaktivität gemacht werden. Der Abschnitt zur cytomorphologischen Charakterisierung des LMAN (2. 2.) schließt mit einem Vergleich zum Myelinisierungsprozeß des LMAN beider Geschlechter und dem HVC, um anhand der Myelinisierung Aussagen zur Einschränkung von neuronaler Plastizität in den beiden Kernregionen zu gewinnen. Die Konnektivität des LMAN, sowie des RA wurde anhand intrazellulärer Ableitungen am Hirnschnitt-Präparat untersucht. Die überraschenden Ergebnisse hierzu sind im Abschnitt 2. 3. zusammengefaßt.

Um die Frage beantworten zu können, ob die während der Entwicklung auftretenden neuronalen Veränderungen auch in einem kausalen Zusammenhang mit dem Gesangslernen zu sehen sind, werden Zebrafinken ohne ein Gesangsvorbild aufgezogen. Da Zebrafinken ihren artspezifischen Gesang nur durch ein entsprechendes Vorbild erlernen können, wird ihnen bei der Aufzucht *ohne* einen Gesangstutor die Möglichkeit genommen, einen Zebrafinkengesang zu hören und das Gesangsmuster dementsprechend neuronal abzuspeichern. Hierbei wachsen Zebrafinken nur mit ihrer Mutter und ihren Geschwistern gemeinsam auf. Sobald Jungtiere geschlüpft sind, wird der Vater aus dem Nest entfernt. Auch sonst gibt es keine adulten Männchen in den Versuchsräumen. Diese Form der Gesangsdeprivation ist ein sehr milder Eingriff in den Entwicklungsablauf eines Jungtieres. Aber es ist ein entscheidender Einschnitt für die Gesangsentwicklung, denn das Jungtier kann kein adäquates Gesangsmuster hören und somit auch keinen arteigenen Gesang lernen. Die Ergebnisse zu den Veränderungen im Gesangsmuster, sowie den Veränderungen auf der neuronalen Ebene aufgrund dieser spezifischen Aufzuchtbedingung sind in Kapitel 3

zusammengefaßt dargestellt. Inwiefern es im Frequenz- und Zeitmuster zu Störungen kommt, ist in Abschnitt 3.1. dargestellt. Abschnitt 3. 2. stellt die Effekte der Gesangsdeprivation auf das dendritische Verzweigungsmuster und den dendritischen Spines im LMAN dar, die in der Literatur ersten nachgewiesenen morphologischen Effekte von Gesangsdeprivation. Um zu überprüfen, ob auch andere Gesangskerne morphologische Veränderungen aufgrund von Gesangsdeprivation aufweisen, und damit einen Nachweis zu erbringen, daß Gedächtnis auch beim Vogel in verschiedenen Gehirnarealen abgelegt ist, wurde die neuronale Struktur im HVC und RA untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Abschnitt 3. 3. dargestellt.

Mit diesem vergleichenden entwicklungsbezogenen morphologischen Ansatz dargestellt im Kapitel 2 und Kapitel 3 sollten die prinzipiellen strukturellen Mechanismen herausgearbeitet werden, die für das Gesangslernen von Bedeutung sind. Zusätzlich zu den Studien am Zebrafinken, einem closed-ended learner, haben wir Untersuchungen zur Steroidsensitivität und zum Sexualdimorphismus beim Kanarienvogel, einem open-ended learner, durchgeführt. Dabei stellten wir uns die Frage, welchen Einfluß Testosteron auf die Synaptogenese in Gesangskernen bei Weibchen hat. Mit der Beantwortung dieser Frage haben wir erstmalig in der Literatur nachgewiesen, daß Testosteron eine Zunahme von Synapsen bewirkt und die präsynaptischen Areale vergrößert. Diese Befunde werden in Kapitel 4, Abschnitt 4. 1. näher erläutert. Eine weitere Frage, die sich im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Größe von dem Gesangkern HVC bei Männchen und Weibchen ergab, war die Frage, ob sich beim Kanarienvogel mit der unterschiedlichen Volumengröße auch die Neurone im HVC unterscheiden? Die Vielfalt der Neuronentypen im HVC, sowie ihr Erscheinungsbild bei Männchen und Weibchen wird in Abschnitt 4. 2. beschrieben. Diese grundlegende quantitative morphologische Studie am Kanarienvogel ist auch heute noch interessant und wird für die Klassifizierung von Neuronentypen auch in anderen Vogelarten herangezogen.

Kapitel 2

MORPHOGENESE UND NEURONALE KONNEKTIVITÄT TELENCEPHALER STRUKTUREN IM GESANGSSYSTEM DES ZEBRAFINKEN

2. 1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Größe von Kernregionen und dem Gesangsverhalten?

Innerhalb der Singvögel gibt es ein breites Spektrum von Gesangsstrukturen, von einfachen bis hoch komplexen Mustern, die sich im Laufe der Evolution aufgrund sexueller Selektion im Zusammenhang mit der Verteidigung des Territoriums sowie auch beim Weibchenerwerb entwickelt haben (Catchpole, 1986). Männchen mit großem Gesangsrepertoire können Feinde effektiver abwehren, auf Weibchen attraktiver wirken und dadurch schneller zum Bruterfolg kommen als Männchen mit einem kleineren Gesangsrepertoire (King und West, 1990; Brenowitz, 1997). Einen Zusammenhang zwischen Gesangsrepertoire und der Größe von Gesangkernen wurde erstmals für den HVC und den RA beim Kanarienvogel aufgezeigt (Nottebohm et al., 1981). Einen Zusammenhang zwischen Gesangsrepertoire und dem Volumen von Gesangkernen konnte auch für zwei regional getrennte Unterarten der Sumpfsaunkönige (*Cistothorus palustris*) festgestellt werden (Canady et al., 1984). Ein Vergleich zwischen verschiedenen Arten unter Berücksichtigung phylogenetischer Effekte zeigte ebenso eine positive Korrelation zwischen HVC-Volumen und der Größe des Gesangsrepertoires auf (DeVoogd et al., 1993). Allerdings ist ein solcher Zusammenhang nicht immer zwingend, vielmehr können auch andere Parameter der Gesangsstruktur, wie Gesangsdauer, Häufigkeit oder Anzahl der Elemente innerhalb eines Motivs mit der Größe der Gesangskerne korrelieren. So gibt es beim Zebrafinken einen positiven Zusammenhang zwischen dem HVC-Volumen und der Anzahl der Elemente, die ein Jungtier von seinem Tutor lernen kann (Ward et al., 1998). Im allgemeinen singen bei den meisten Singvogelarten vor allem die Männchen, die Weibchen singen weniger oder garnicht und ein solch stark ausgebildeter Sexualdimorphismus auf der Verhaltensebene spiegelt sich, wie bereits erwähnt, deutlich in der Größe der Gesangskerne wider (Nottebohm und Arnold, 1976; Konishi und Akutagawa, 1985; Arnold et al., 1986). Singen dagegen Männchen und Weibchen einer Art gleich viel, wie z.B. bei einer Duettsängerart (*Thryothorus nigricapillus*), so unterscheiden sich deren Gesangskerne kaum in ihrer Größe (Brenowitz et al., 1985).

Zahlreiche Beispiele aus der Literatur belegen einen mehr oder weniger klaren Zusammenhang zwischen Verhaltensparametern und der Größe der Gesangskerne (Ball et al., 1994).

Die Volumina der Gesangskerne HVC und RA sind bereits in der frühen Ontogenese sexualdimorph.

Die Gesangskerne HVC und RA in adulten Zebrafinkenmännchen sind um ein Vielfaches größer als bei Weibchen. Diese Größenunterschiede lassen sich bereits in den Anschnittsflächen der Kernregionen erkennen. Die Abbildung 4 zeigt exemplarisch Anschnittsflächen von 100 µm dicken Lateralschnitten, an denen bereits der Sexualdimorphismus der Kernregionen HVC (Abb. 4c, d) und RA (Abb. 4e, f) sichtbar wird. Der LMAN dagegen (Abb. 4a, b) unterscheidet sich zwischen den Geschlechtern nicht, wie noch später gezeigt werden wird. Für den HVC und RA war bekannt, daß in der frühen postnatalen Entwicklung die Kernregionen bei Weibchen ebenso stark ausgeprägt sind wie bei den Männchen (Nottebohm und Arnold, 1976; Bottjer et al., 1985; Kirn und DeVoogd, 1989). Daher stellt sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt in der Ontogenese sich die Kernregionen HVC und RA bei Männchen von denen der Weibchen unterscheiden. Für den HVC und RA, beides Kernregionen, die für die motorische Kontrolle der Gesangsproduktion bei Männchen verantwortlich sind, sollte ein Sexualdimorphismus schon sehr früh in der Entwicklung zu erkennen sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, haben wir in kleinen Zeitintervallen im Abstand von 10 Tagen die Größe der Gesangskerne HVC und RA anhand von 100 µm Vibratomschnitten bestimmt (Nixdorf-Bergweiler, 1996). Dabei bestätigte sich unsere Hypothese, daß die Kernregionen der prämotorischen Bahn schon sehr früh sexualdimorph sein sollten, da der HVC bei Männchen bereits mit 20 Tagen (Abb. 5B) und der RA mit 30 Tagen (Abb. 5C) größer als bei Weibchen ist. Demnach etabliert sich noch vor dem Beginn der motorischen Phase, die nur bei Männchen stattfindet, ein Sexualdimorphismus. Bei Weibchen verkleinert sich bis zum 40.Tag sowohl der HVC als auch der RA dramatisch, wohingegen bei Männchen eine enorme Größenzunahme während der gesamten Gesangsentwicklungsphase für den RA bis zum 50. Tag und für den HVC bis zum 60. Tag zu beobachten ist. Die detaillierte Volumenmessung der Gesangskerne konnte somit einen genauen Zeitverlauf der Größenentwicklung, sowie die Unterschiede zwischen den Geschlechtern in der Entwicklung aufzeigen. Repräsentieren HVC und RA Kernregionen

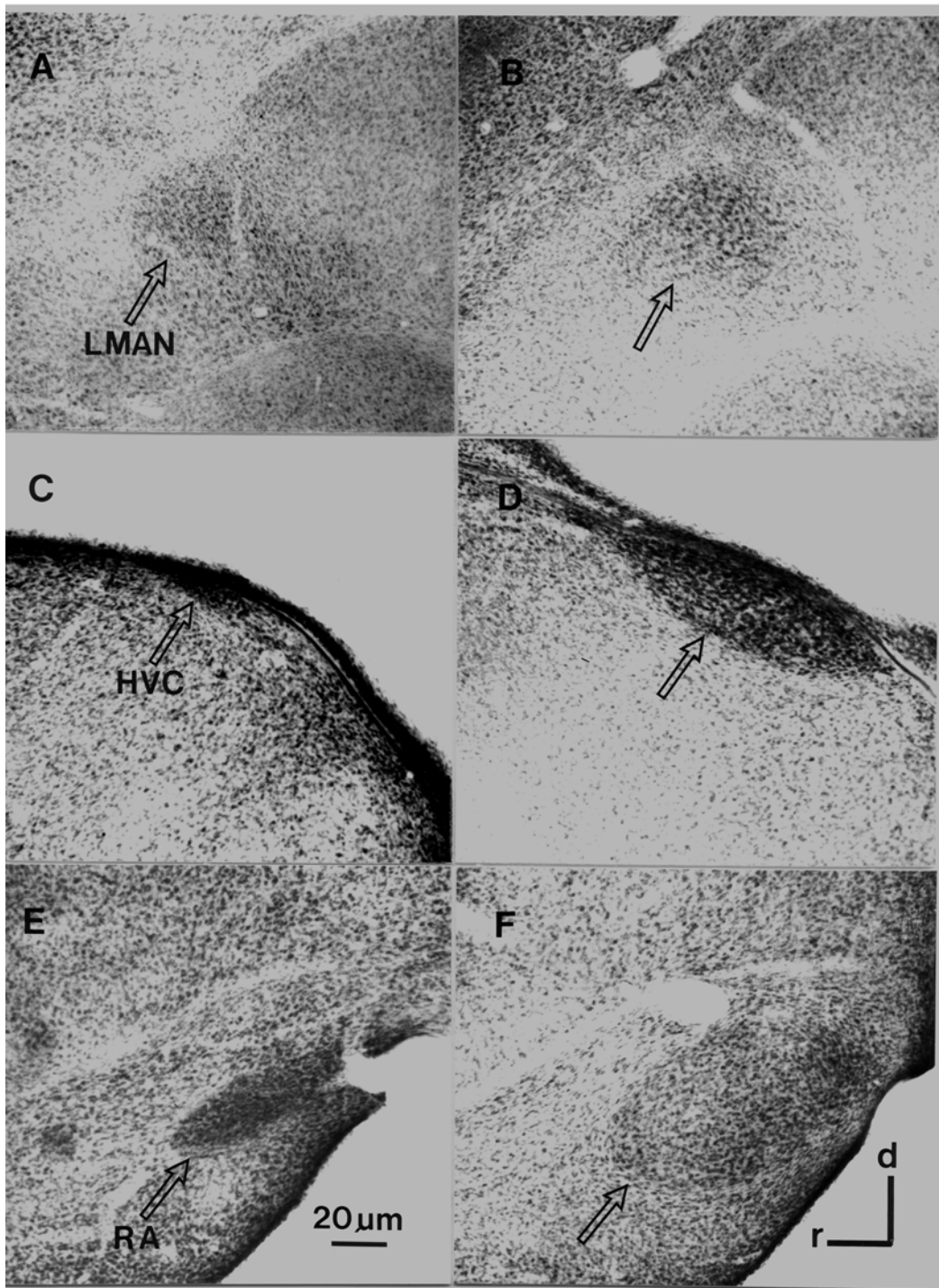


Abb. 4: Repräsentative 100 µm dicke Sagittalschnitte (Vibratom) von Gesangskernen adulter Zebrafinken (Nissl-Färbung). Die Gesangskerne LMAN (oben), HVC (Mitte) und RA (unten) sind für Männchen rechts und für Weibchen links abgebildet. Starke Geschlechtsunterschiede sind im HVC (Mitte) und im RA (unten) bereits in den Anschnittsflächen der Kernregionen zu erkennen. Für den LMAN (oben) dagegen treten im Nissl-Präparat kaum Größenunterschiede zwischen den Geschlechtern auf. Die Pfeile markieren jeweils die ventrale Lage der Kernregion im Schnittpräparat. d dorsal, r rostral

der motorischen Bahn, so gehören die area X und der LMAN zur AFP, die maßgeblich am *Gesangslernen* beteiligt ist. Unsere Daten zeigen, daß bei Männchen die area X bereits mit 40 Tagen Adultgröße erreicht, also weitaus früher als die prämotorischen Kerne HVC und RA (Abb. 5D). Die schnellere Volumenentwicklung der area X könnte daher im Zusammenhang

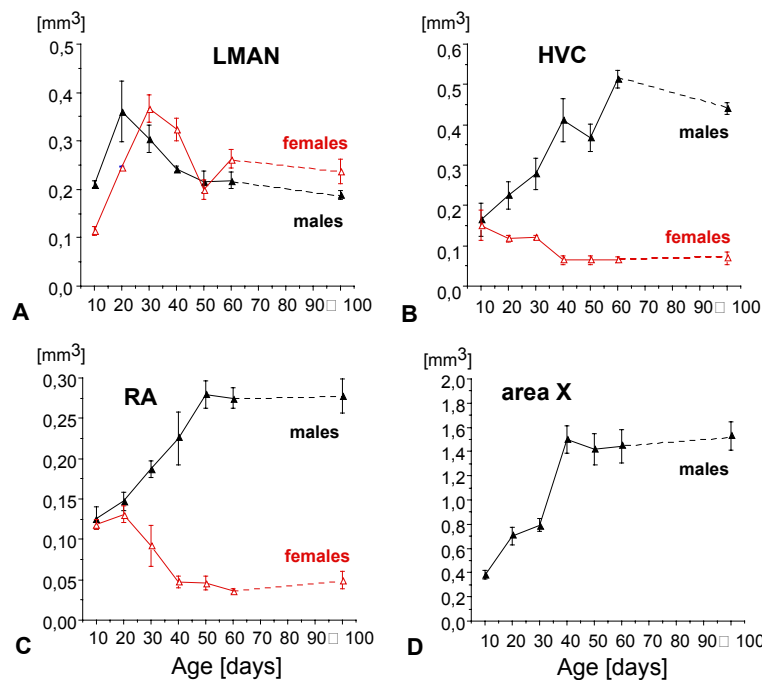


Abb. 5: Volumenentwicklung der Gesangkern LMAN (A), HVC (B), RA (C), und area X (D) bei Zebrafinchen. In erwachsenen Tieren (≥ 100 Tage) ist der HVC bei Männchen, sowie auch der RA um ein Vielfaches größer als bei Weibchen. Der LMAN hingegen unterscheidet sich kaum zwischen den Geschlechtern und weist bei Männchen sowie Weibchen einen ähnlichen Entwicklungsverlauf auf. Eine area X ist bei Weibchen nicht vorhanden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. (aus: Nixdorf-Bergweiler, 1996)

mit der Template-Formation für das artspezifische Gesangsmuster angesehen werden, denn nach Doya und Sejnowski (2000) sollte die area X als Gedächtnisspeicher dienen, mit deren Hilfe Zebrafinchen ihre eigene Vokalisation beim Gesangslernen überprüfen (1. 3. 5). Das artspezifische Gesangsmuster sollte bereits mit 35 Tagen in Form eines Gedächtnisses vorhanden sein, wie Verhaltensdaten an Zebrafinchen zeigen (Böhner, 1990). Für Weibchen konnten keine Volumendaten erhoben werden, da die area X im Nissl-Präparat bei Weibchen nicht sichtbar ist.

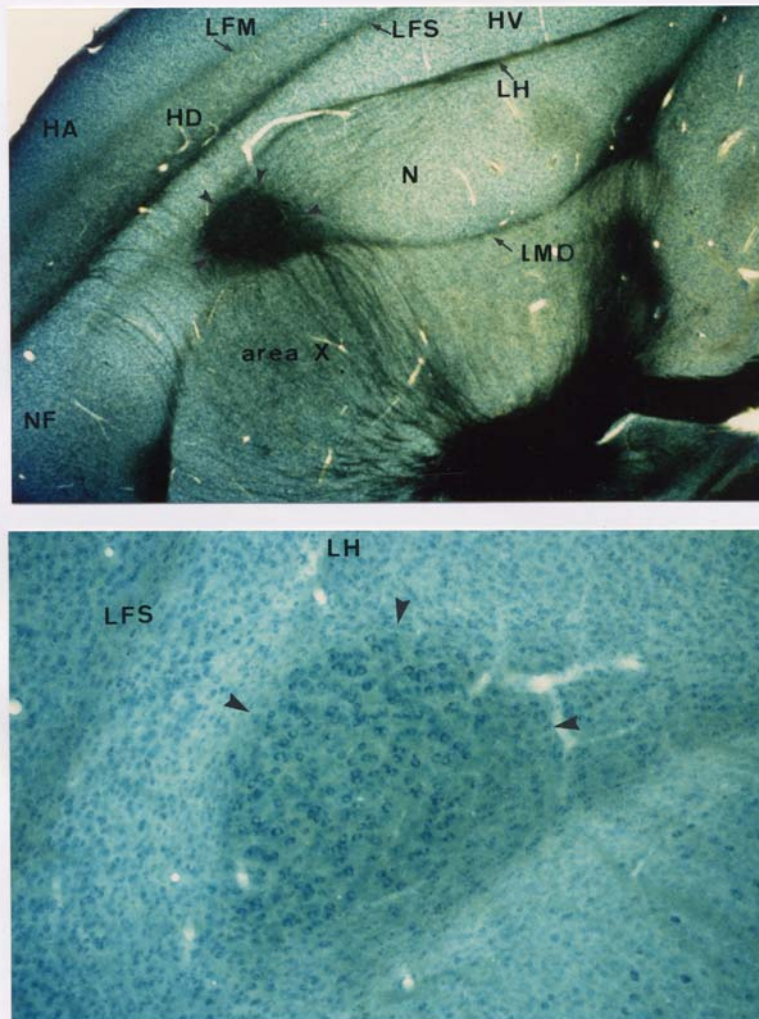
In der Volumenentwicklung des LMAN treten beim Zebrafinken keine prinzipiellen Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf.

Ein weiteres Gesangsareal, das zur AFP gehört, ist der LMAN (Abb. 4, 6). Volumendaten über den LMAN in adulten Weibchen fehlten, da die Grenzen des LMANs in konventionellen histologischen Präparaten mit Schnittdicken von 30 μm oder weniger nicht eindeutig erkennbar sind. Somit war unklar, ob neben der area X, dem HVC und dem RA, auch der LMAN in adulten Tieren sexualdimorph ist. Das Problem der Identifizierung von LMAN im Schnittpräparat wurde gelöst, indem dicke Vibratomschnitte (100 μm) zur Volumenanalyse herangezogen wurden (Nixdorf-Bergweiler, 1996). Überraschenderweise konnte in der Größe der LMAN-Volumen in adulten Tieren kein Unterschied zwischen den Geschlechtern nachgewiesen werden (Abb. 4, 5A). Ebenso überraschend war der Befund, daß auch in der Entwicklung des LMAN-Volumens Männchen und Weibchen sich kaum voneinander unterscheiden. Wie bei Männchen so verkleinert sich auch bei Weibchen der LMAN vom ca. 30. Tag an und nimmt mit 50 Tagen in beiden Geschlechtern seine Adultgröße ein (Abb. 5A). Wenn die Volumenentwicklung vom LMAN in beiden Geschlechtern sich prinzipiell nicht unterscheidet, so könnte man aufgrund der oben angeführten Zusammenhänge zwischen Kernvolumen und Verhalten vermuten, daß der LMAN für beide Geschlechter von ähnlicher Bedeutung ist. Interessanterweise konnte für eine andere Art, dem Kupsperling (*Molothrus ater*), gezeigt werden, daß auch hier der LMAN in beiden Geschlechtern gleich groß ist (Hamilton et al., 1997). Bei Kupsperlingen singen wie beim Zebrafinken nur die Männchen, die Weibchen singen nicht. Weibliche Kupsperlinge können aber sehr wohl unterschiedliche Gesangstypen unterscheiden und bevorzugen den Gesang lokal ansässiger Männchen (King und West, 1990). Auch Zebrafinkenweibchen sind in der Lage unterschiedliche Gesangsmuster zu unterscheiden. Ihr Diskriminationsvermögen ist so gut, daß sie, wie bereits erwähnt (1.3.3) sogar innerhalb einer einzeln dargebotenen Note den Wegfall einer Harmonischen erkennen (Miller, 1979; Cynx et al., 1990). Die Rolle des LMAN bei dieser Diskriminierungsaufgabe wurde allerdings nicht untersucht. Für den Kupsperling konnte dagegen gezeigt werden, daß die Größe des Kernvolumens des LMAN bei Weibchen in einem engen Zusammenhang zu ihrer Antwortreaktion auf verschiedene Balzgesänge steht. Das wiederum bedeutet, daß der LMAN bei Kupsperlingsweibchen eine wichtige Rolle bei der Gesangswahrnehmung einnimmt. Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen der Größe des LMAN-Volumen bei Weibchen und der Komplexität des Männchengesangs konnte auch

für den Europäischen warbler (Sylviidae) festgestellt werden (DeVoogd et al., 1996). Auch bei Männchen spielt der LMAN eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung von Gesangsstrukturen (bei Kanarienvögel: Burt et al., 1997; bei Zebrafinken: Scharff et al., 1999). Aufgrund dieser und oben angeführten Befunde, könnte auch bei Zebrafinkenweibchen der LMAN eine entscheidende Rolle in der Gesangswahrnehmung spielen. Die Frage, ob mit der gemeinsamen Volumenentwicklung des LMANS bei Zebrafinken auch in den neuronalen Parametern ein ähnlicher Entwicklungsverlauf stattfindet, wurde in einer detaillierten Strukturanalyse untersucht.

2. 2. Cytomorphometrische Charakterisierung der Entwicklung neuronaler Strukturen im LMAN, einer Kernregion, die an Lernprozessen beteiligt ist.

Der laterale magnocelluläre Nucleus des anterioren Neostriatums (LMAN) ist dorsal von der Lamina hyperstriatica (LH) und ventral von der Lamina medullaris dorsalis (LMD) eingebettet und lässt sich bei Männchen aufgrund seiner relativ großen Zellkörper sehr gut von anderen neostriatalen Bereichen abgrenzen (Abb. 6). Die Kernregionen der anterioren Vorderhirnschleife, zu der auch der LMAN gehört, entwickeln ihre afferenten und efferenten Verbindungen beim Männchen relativ früh in der Ontogenese. Eine Innervation des LMANS vom thalamischen DLM kann bereits am 15. Tag beobachtet werden (Johnson und Bottjer, 1992). Zur gleichen Zeit haben auch LMAN-Neurone durch ihre Axone eine Verbindung mit dem RA aufgebaut (Mooney, 1992). Bis zum 35. Tag vergrößert sich das Innervationsgebiet des DLMs um das Dreifache, um sich dann wieder auf einen kleineren Bereich einzuschränken (Johnson und Bottjer, 1992). Dabei enden die DLM-Axone auch außerhalb des Nissl-definierten LMAN. In adulten Zebrafinken wird der LMAN aufgrund seines Projektionsmusters in eine „core“-Region (LMANcore) und in eine „shell“-Region (LMANshell) unterteilt: der dorsolaterale Teil des DLMs projiziert in den LMANcore, die ventromediale DLM-Region projiziert in die LMANshell-Region, die durch kleinere Zellen gekennzeichnet ist (Johnson et al., 1995; Bottjer und Johnson, 1997). LMANcore wiederum gibt seine Axone zum RA, LMANshell sendet Axone ins Archistriatum unmittelbar lateral vom RA. Für die Entwicklung dieses spezifischen Projektionsmusters liegen noch keine Daten vor. Mit dem Abbau der DLM-Terminalien, verkleinert sich auch die LMANcore-Region (Bottjer et al., 1985; Bottjer und Sengelaub, 1989; Burek et al., 1991, Nixdorf-Bergweiler, 1996). Obwohl der LMAN sich auf die Hälfte seines Volumens beim Männchen



Light micrographs of a representative 100 µm vibratome section stained with Toluidine Blue / Methylene Blue showing the distinctive borders of lMAN at low (A) and high magnification (B) in an adult zebra finch male.

HA Hyperstriatum accessorium, HD Hyperstriatum dorsalis, HV Hyperstriatum ventrale, lMAN lateral nucleus magnocellularis of the anterior neostriatum, LH Lamina hyperstriatica, LFS Lamina frontalis superior, LFM Lamina frontalis suprema, LMD Lamina medullaris dorsalis, N Neostriatum, NF Neostriatum frontalis

Abb. 6: Repräsentativer 100 µm dicker Vibratomschnitt, der die Lage des LMAN im anterioren Neostriatum zeigt. Der LMAN ist durch Pfeilspitzen markiert (Sagittalschnitt).

verkleinert, bleiben die Verbindungen zum RA im erwachsenen Tier erhalten (Nordeen et al., 1992). Ein Verlust an Neuronen wurde bisher lediglich in einem frühen Entwicklungszeitraum zwischen 20 und 35 Tagen gemessen (Bottjer et al., 1985; Nordeen und Nordeen, 1988; Bottjer und Sengelaub, 1989; Burek et al., 1991). Daher stellt sich die Frage, welche morphologischen Strukturen an der Volumenreduktion des LMANs beteiligt sind? Wenngleich ein Gehirnnareal sich offensichtlich größtenteils aus Neuronen zusammensetzt, sollten bei der folgenden Darstellung neuronaler Parameter andere Faktoren wie Gliazellen, Kapillare oder durchziehende Fasersysteme in dieser Fragestellung letztendlich auch mit berücksichtigt werden. Neuronale Strukturen lassen sich durch eine Vielfalt von Parametern charakterisieren.

Während der Gesangsentwicklung nimmt bei Männchen die Anzahl dendritischer Spines ab.

Mit der Golgi-Cox-Methode können einzelne Neurone mit all ihren Fortsätzen einschließlich dendritischer Spines, dargestellt werden (Abb. 7). Daher können mit dieser Methode nicht nur die Anzahl dendritischer Spines entlang eines Dendriten quantifiziert werden, sondern auch Aussagen über die Form und Größe des Dendritenbaumes, des dendritischen Verzweigungsmuster, sowie weiterer Parameter gemacht werden. Wir haben die Entwicklung der Neurone am Golgi-Cox-Präparat in der zentralen „core“ Region des LMANs (LMANcore) beim Männchen untersucht (Nixdorf-Bergweiler, Wallhäusser-Franke und DeVoogd, 1995). Da zum Zeitpunkt der Golgi-Studie diese lokalen Unterscheidungen aber noch nicht bekannt waren, wird in der Arbeit nicht explizit „core“ und „shell“ voneinander differenziert betrachtet. Prinzipiell kann unter „LMAN“ die core-Region verstanden werden (Iyengar et al., 1999). Um ein möglichst umfassendes Bild der neuronalen Struktur in verschiedenen Entwicklungsstadien des Gesangslernens zu erhalten, haben wir Neurone vor dem Beginn des Gesangslernens, während, sowie auch nach dem Gesangslernen analysiert. Daher wurden Zebrafinken im Alter von 21 Tagen, also noch vor dem Beginn der Gesangsentwicklungsphase, sowie im Alter von 35 und 49 Tagen, also während der sensomotorischen Phase des Gesangslernens und im Alter von mehr als 100 Tagen, wenn der Gesang auskristallisiert ist, untersucht und die Neurone charakterisiert. Bevor mit der Analyse einzelner Neurone in den verschiedenen Entwicklungsstadien begonnen werden konnte, mußte zuerst ein Gesamtbild der Neuronentypen im LMAN erstellt werden. Dabei zeigte sich, daß es beim Zebrafinken im LMAN prinzipiell zwei Typen von Neuronen gibt:

einen Neuronentyp mit multipolaren Dendriten, die mit zahlreichen Spines besetzt sind und einen weiteren Neuronentyp, der auch multipolar orientiert ist, aber so gut wie keine Spines an seinen Dendriten aufweist. Wir haben uns auf die Quantifizierung der neuronalen Struktur

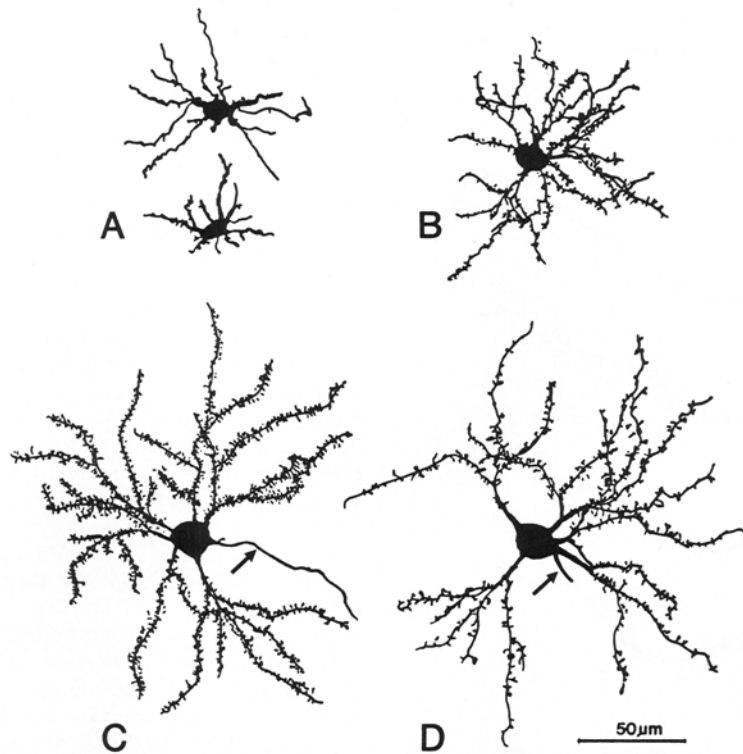


Abb. 7: Repräsentative Camera-Lucida-Zeichnungen Golgi-impregnierter Neurone im LMAN von Zebrafinken im Alter von einer Woche (A), zwei Wochen (B) und drei Wochen (C), sowie von adulten Tieren (D). In sehr jungen Tieren (A) sind dendritische Spines kaum vorhanden, in 2-Wochen alten Tieren (B) dagegen bereits zahlreich repräsentiert. In (C) und (D) weist ein Pfeil auf das vom Zellkörper abzweigende Axon hin. Zwischen dem Neuron in (C) und (D) ist ein hoher Verlust an dendritischen Spines erkennbar.

(aus: Nixdorf-Bergweiler, Wallhäusser-Franke und DeVoogd, 1995)

des spinereichen Neuronentyps fokussiert. In der Abbildung 7 sind Camera-Lucida-Zeichnungen von Golgi-Cox-impregnierten Neuronen aus dem LMAN von verschiedenen Altersstadien bei Männchen dargestellt. Unsere Golgi-Studie zeigte, daß während der gesamten Gesangsentwicklungsphase dynamische Veränderungen an den LMAN-Neuronen stattfinden und daß die gemessenen neuronalen Parameter in erwachsenen Tieren kleinere Werte aufweisen als in Juvenilen (Nixdorf-Bergweiler, Wallhäusser-Franke und DeVoogd, 1995). In der frühen postnatalen Entwicklung kommt es zwischen der 3. und 5. Woche zu einem Anstieg in der Anzahl dendritischer Spines. Nach diesem Anstieg folgt eine Reduktion,

die auch noch nach der 7. Woche fortschreitet, so daß erwachsene Tiere nur noch die Hälfte an dendritischen Spines aufweisen als 35-tägige Männchen (Abb. 8). Die Verminderung des Spinebesatzes und damit auch sehr wahrscheinlich eine Verminderung synaptischer Kontakte findet entlang des gesamten Dendriten statt. Wir haben Neurone aber nicht nur anhand ihrer Spinefrequenz charakterisiert, sondern auch durch eine Vielfalt weiterer neuronaler Parameter

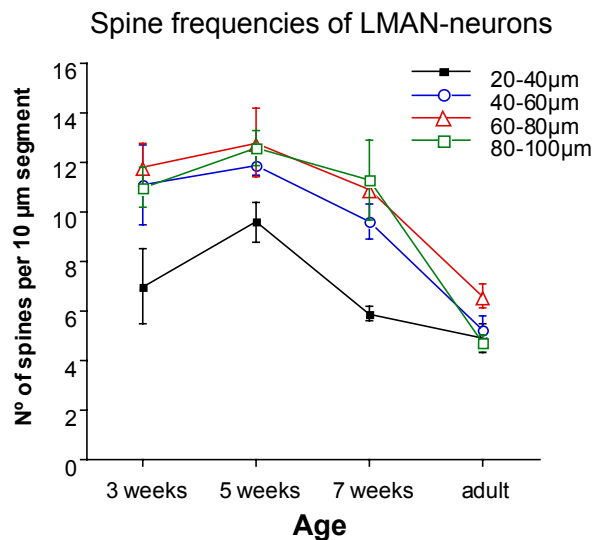


Abb. 8: Dendritische Spinefrequenzen von LMAN-Neuronen verschiedener Altersstadien. Dargestellt ist die mittlere Anzahl dendritischer Spines ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) pro 10 μm Dendritensegment für jedes 20 μm Intervall entlang eines Dendriten in 3-, 5- und 7-Wochen alten Tieren sowie in adulten Zebrafinkenmännchen. Zwischen 3 und 5 Wochen ist ein kleiner, aber signifikanter Anstieg in den Spinefrequenzen aller Dendritenabschnitte zu erkennen. Zwischen 5 und 7 Wochen dagegen reduziert sich die Spinefrequenz. Diese regressive Entwicklung der Spinefrequenz hält weiterhin an und ist zwischen 7-Wochen alten Tieren und Adulten besonders stark ausgeprägt.
(aus: Nixdorf-Bergweiler, Wallhäusser-Franke und DeVoogd, 1995)

wie z.B. der Anzahl primärer Dendriten, der Segmentlänge, dendritische Feldgröße, dendritisches Verzweigungsmuster und der Anzahl dendritischer Endigungen. Im Vergleich zu der dramatischen Veränderung in der Spinefrequenz gibt es nur geringe oder keine Veränderungen in den genannten neuronalen Parametern. So fanden wir weder einen Unterschied in der Anzahl der Dendritensegmente, der dendritischen Endigungen pro Neuron, noch in der durchschnittlichen Dendritensegmentlänge in den entsprechenden Zeitabschnitten, also zwischen 3, 5 und 7 Wochen, sowie adulten Tieren (≥ 100 Tage). Eine detaillierte Sholl-Analyse zeigte aber, daß auch das Dendritenmuster sich verändert hat: in adulten Tiere enden die Terminalsegmente näher am Zellkörper als in juvenilen Tieren. Diese Reduktion geht auf

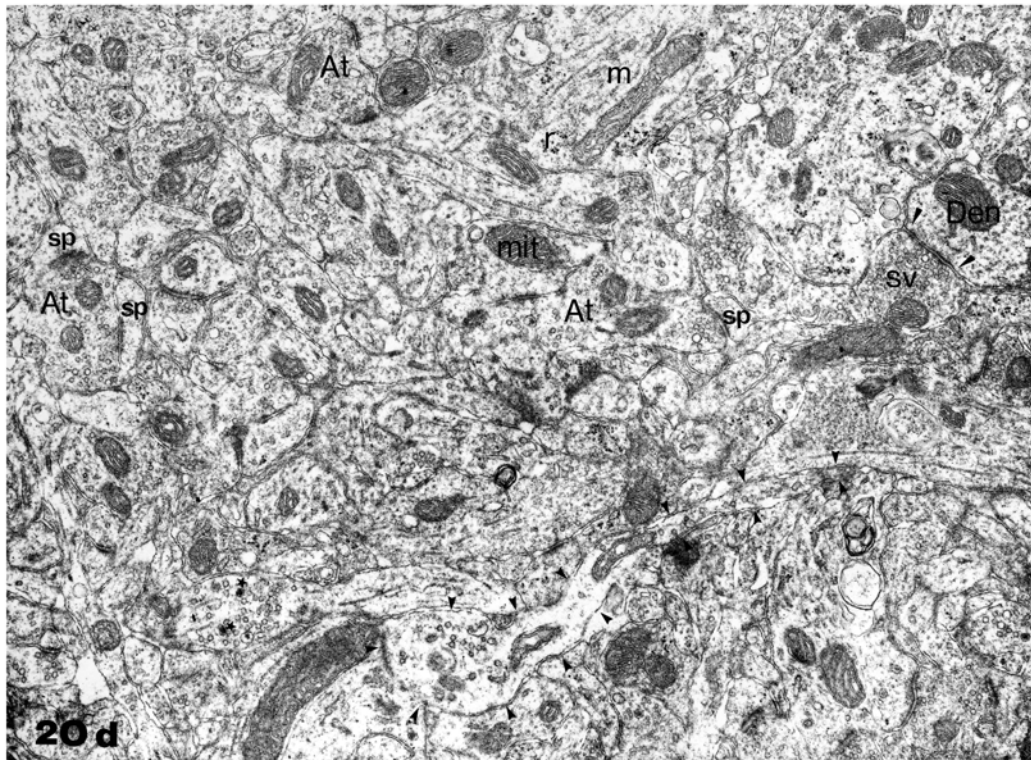
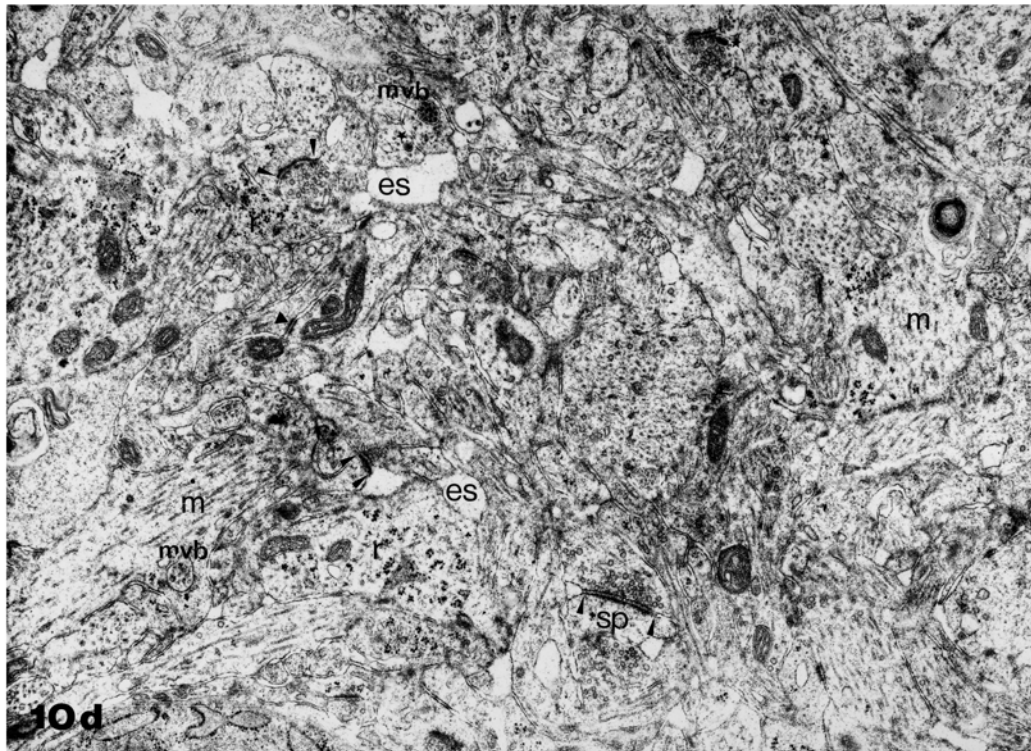
die Verkürzung tertiärer Dendritensegmente zurück, primäre und sekundäre Dendritensegmente hingegen verändern ihren Abstand vom Zellkörper nicht. Damit könnte die Entwicklung primärer und sekundärer Dendriten einem genetischen Programm folgen, tertiäre Dendriten hingegen unmittelbar von spezifischen Eingangssignalen abhängig sein. Insgesamt betrachtet, nimmt die Entwicklung im LMAN einen langen Zeitraum ein, da auch noch nach 7 Wochen regressive Veränderungen im Dendritenmuster, sowie in der Anzahl dendritischer Spines stattfinden. Während der gesamten Gesangsentwicklungsphase verändern sich demnach die Neurone in ihrer morphologischen Struktur. Eine solche regressive Entwicklung wie sie im LMAN beim Vogel aufgezeigt wurde (Nixdorf-Bergweiler, Wallhäusser-Franke und DeVogd, 1995), wird auch während verschiedener Entwicklungsprozesse bei Säugern beschrieben (e.g. Rakic et al., 1986). Für den visuellen Cortex konnte z.B. gezeigt werden, daß nach einem anfänglichen Überangebot an synaptischen Verbindungen nur solche Kontakte erhalten bleiben, die für das System von Bedeutung sind und somit ihre synaptischen Verbindungen erhalten und manifestieren können (Shatz, 1996). Die Hypothese einer spezifischen Reduktion, bzw. eines selektiven Erhalts einiger weniger Verbindungen aus einer großen Population aufgrund kompetitiver Mechanismen wurde von Changeux und Danchin (1976) ausformuliert. Eine Reduktion dendritischer Spines in spezifischen Gehirnarealen wurde auch bei verschiedenen Prägungsvorgängen nachgewiesen, wie der sexuellen Prägung beim Zebrafinken und der akustischen Prägung beim Hühnchen (Wallhäusser und Scheich, 1987; Rollenhagen und Bischof, 1991; Bock und Braun, 1999; Braun et al., 1999). Damit könnte es sich bei den beobachteten regressiven Entwicklungsvorgängen um generelle Mechanismen handeln, wie sie in der entwicklungs- und erfahrungsabhängigen Plastizität eine wichtige Rolle spielen.

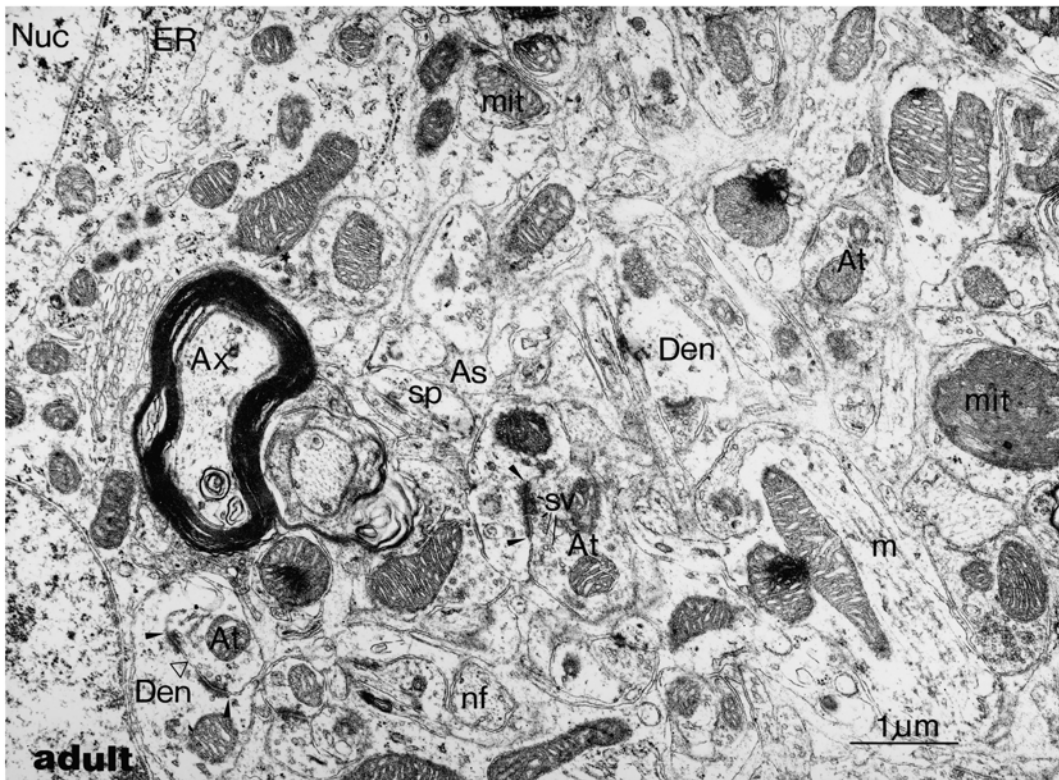
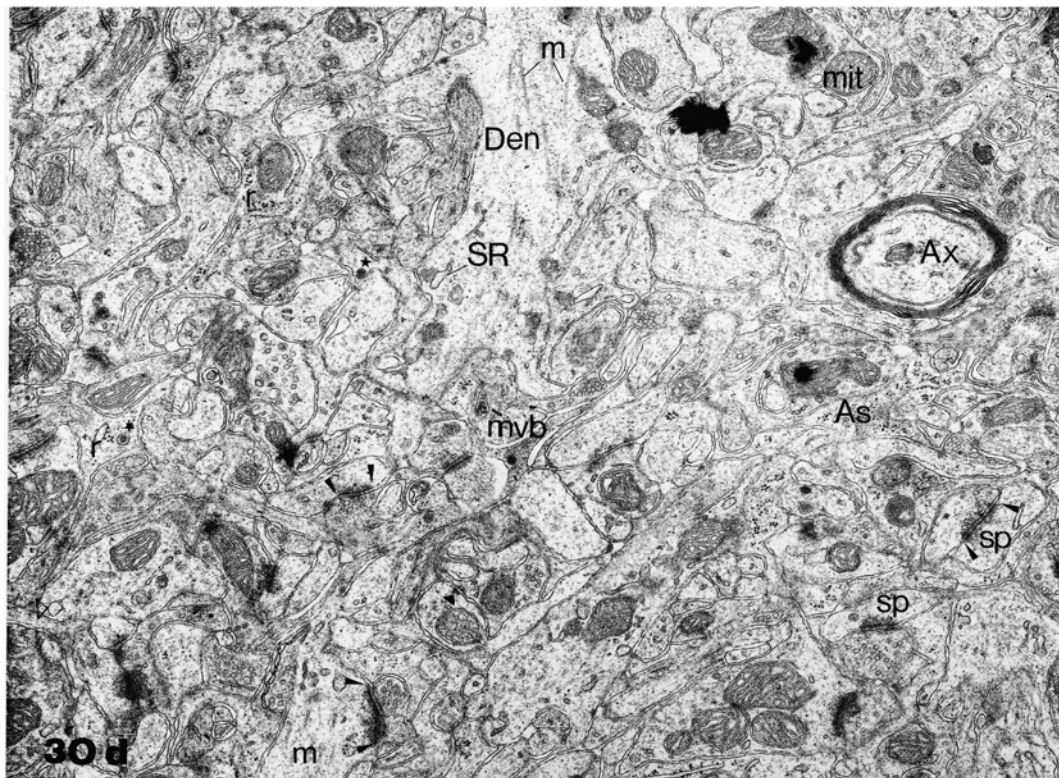
Die Reduktion dendritischer Spines geht mit synaptischen Veränderungen einher

Dendritische Spines stellen im allgemeinen den postsynaptischen Teil einer Synapse dar (Peters et al., 1991). Im Golgi-Präparat ist nur dieser Teil der Synapse erkennbar: der präsynaptische Teil, wobei es sich zumeist um eine axonale Endigung handelt, sowie der synaptische Spalt sind im Golgi-Präparat nicht zu sehen. Es wird allerdings davon ausgegangen, daß dendritische Spines von präsynaptischen Strukturen besetzt sind, was nicht immer notwendigerweise der Fall sein muß (Wolff, 1981). Um zu überprüfen, ob die dendritischen Spines im Golgi-Präparat tatsächlich synaptische Kontakte repräsentieren, habe

ich in einer elektronenmikroskopischen (EM) Entwicklungsstudie die Synapsendichte im LMAN bestimmt (Nixdorf-Bergweiler, unveröffentlicht). Die Abbildung 9 zeigt EM-Aufnahmen aus dem Neuropil des LMAN von 10-, 20- und 30-tägigen (10d, 20d, 30d), sowie von adulten Männchen (ad). In 10-tägigen Zebrafinken sind nur sehr wenige Synapsen im LMAN zu sehen. Einzelne synaptische Kontakte können aber schon recht gut differenziert sein, wie ein axo-dendritischer Kontakt an einem Spine (sp) in der unteren Bildhälfte in 10d zeigt. In der EM-Aufnahme eines 20-tägigen Männchens (20d) ist ein Axon mit seinem Endknöpfchen längs angeschnitten zu erkennen. Sein Verlauf ist durch Pfeilspitzen markiert. Zahlreiche Synapsen, die durch ein präsynaptisches Areal (At), einen synaptischen Spalt, sowie einer postsynaptischen Struktur (Den, sp) gekennzeichnet sind, charakterisieren das Bild. Zahlreiche Synapsen finden sich auch im Neuropil des LMANs von 30- und 40-Tage alten Tieren. Typisch für adultes Gewebe (ad) ist eine geringere Anzahl von Synapsen sowie das Vorhandensein von Myelin. Ein quer angeschnittenes myelinisiertes Axon (Ax) ist in der linken Bildhälfte zu sehen und markiert. Direkt unterhalb des Axons befindet sich ein präsynaptisches Areal, was von einem Dendritenfortsatz (Den) umhüllt wird. Die synaptische Kontaktzone, markiert durch Pfeilspitzen, ist bei dieser Synapse an einer Stelle unterbrochen (offenes Dreieck). Ein solcher Synapsentyp wird „perforierte Synapse“ genannt. Anhand der EM-Studie konnte ich zeigen, daß während der Entwicklung die Synapsendichte ähnlich wie die dendritischen Spines im Golgi-Präparat sich um mehr als die Hälfte reduziert (Abb. 10). Daher ist anzunehmen, daß die dendritischen Spines im Golgi-Präparat synaptische Kontakte repräsentieren. Während der Gesangsentwicklung findet aber nicht nur ein Abbau von

Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus dem Neuropil des LMAN von Zebrafinkenmännchen im Alter von 10 (10d), 20 (20d) und 30 Tagen (30d), sowie von adulten Tieren (adult: > 100 Tage). Die Fotokollage soll einen Einblick in die Feinstruktur des LMANs vermitteln und die Entwicklung von Synapsen auf ultrastruktureller Ebene dokumentieren. Strukturelle Komponenten von Synapsen wie das präsynaptische Areal (At, Axon terminal) oder das postsynaptische Element, im allgemeinen ein Dendrit (Den) oder ein dendritischer Spine (sp) sind punktuell exemplarisch gekennzeichnet. Der synaptische Spalt zwischen prä- und postsynaptischen Element ist bei dieser Vergrößerung nur bei einigen wenigen Synapsen gut erkennbar. Die Länge synaptischer Kontaktzonen sind ebenso exemplarisch an einigen Synapsen durch Pfeilspitzen markiert. In 10-tägigen Tieren (10d) sind Synapsen kaum vorhanden und zudem noch sehr undifferenziert. In 20-Tage alten Tieren (20d) sind dagegen bereits viele Synapsen zu erkennen, wie auch im Gewebe von 30-tägigen (30d). In Adulten hingegen verringert sich die Synapsendichte (Näheres siehe Text).





Synapsen statt, sondern auch eine weitere Differenzierung subsynaptischer Parameter. Bei der Längenmessung synaptischer Kontaktzonen stellte sich heraus, daß sich in Männchen die synaptischen Kontaktzonen um 36 % von etwa 300 nm im juvenilen Stadium auf 400 nm im adulten Tier verlängern. Bei weiblichen Zebrafinken dagegen bleibt die Länge der synaptischen Kontaktzone während der gesamten Entwicklungsphase vom 10. Tag an mit einem Wert von 350 nm relativ konstant. Der Längenunterschied im adulten Tier zwischen Männchen und Weibchen ist signifikant, sowie auch die Synapsendichte, die bei Weibchen

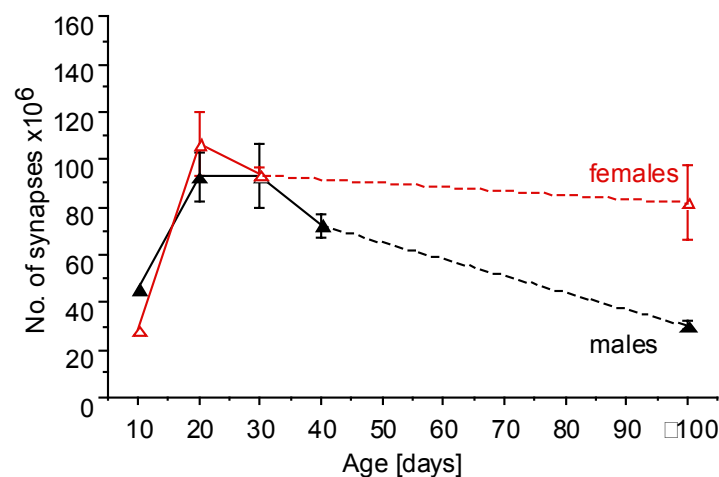


Abb. 10: Entwicklungsverlauf der Synapsenanzahl männlicher und weiblicher Zebrafinken im LMAN ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Während in juvenilen Tieren in der Synapsenanzahl kein Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt werden kann, weisen adulte Tiere ($\geq 100\text{d}$) einen starken Sexualdimorphismus auf. In weiblichen Tieren bleibt die Synapsenanzahl erhalten, bei Männchen hingegen nimmt die Synapsenanzahl dramatisch um mehr als die Hälfte ab.

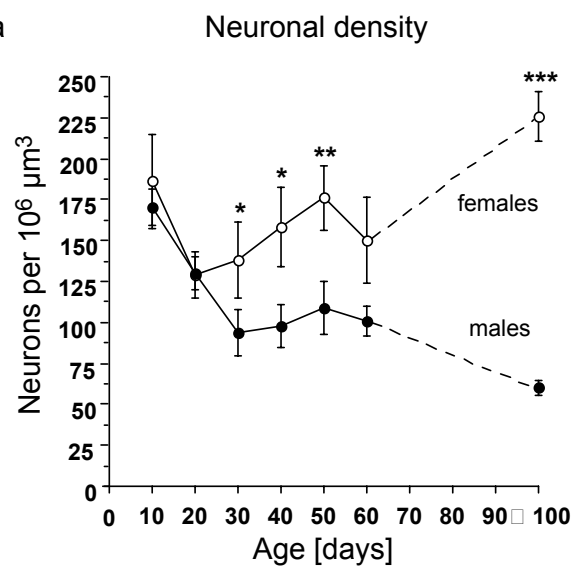
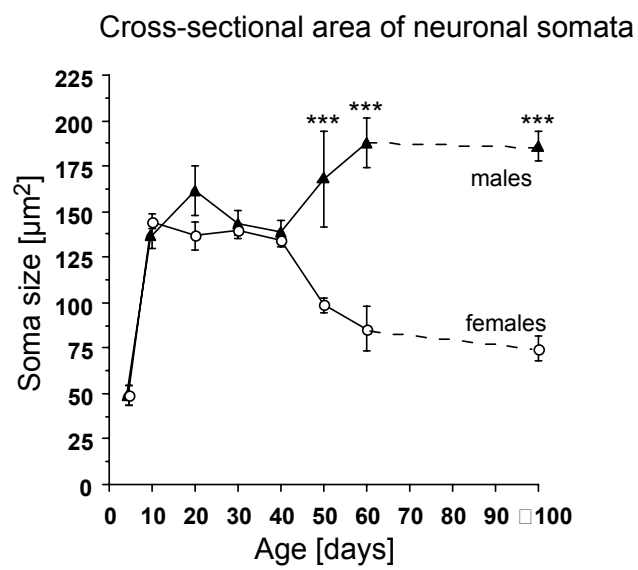
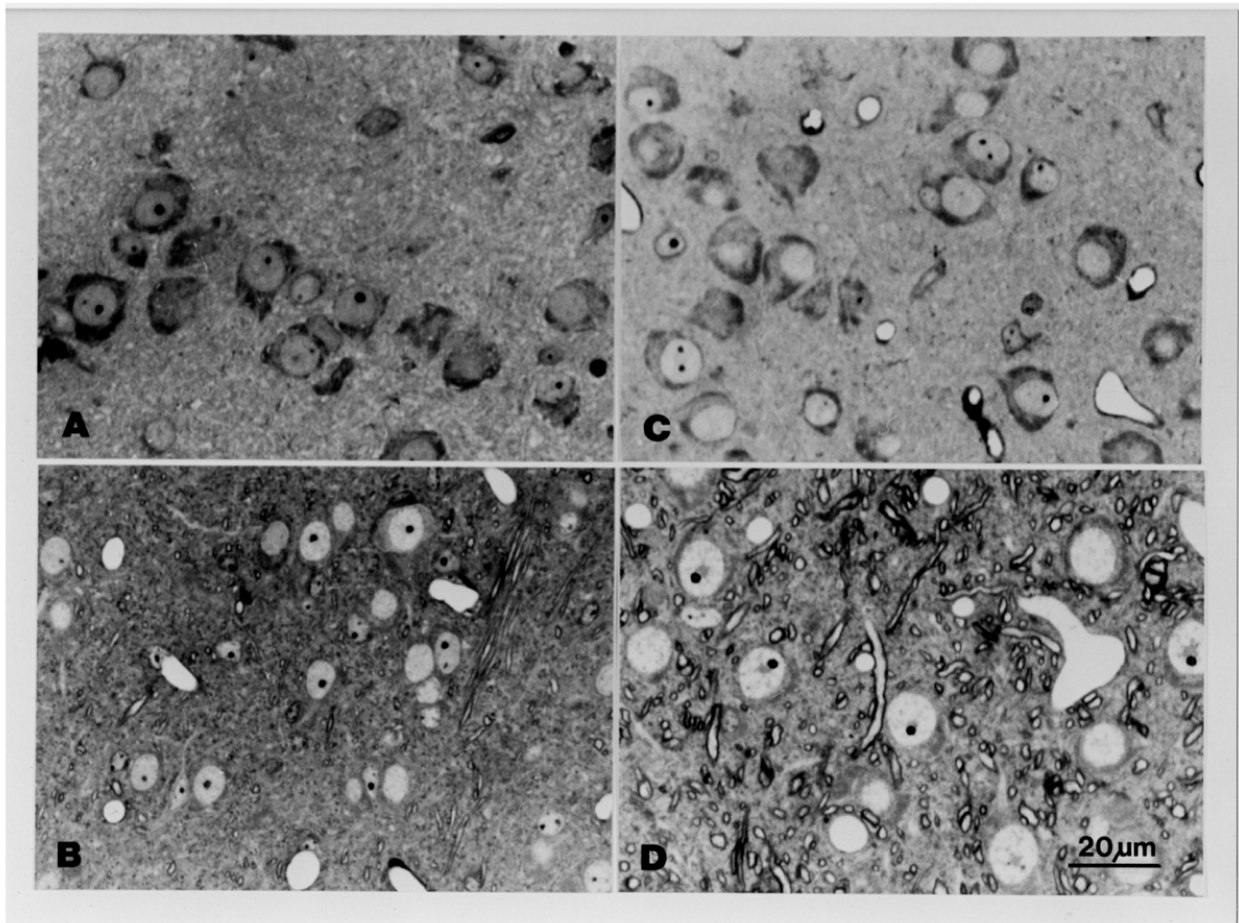
unverändert hoch ist. Ich vermute, daß die synaptischen Veränderungen, wie sie bei Männchen zu beobachten sind, erfahrungsabhängige Veränderungen aufgrund des Gesangslernens reflektieren. Ein weiterer Nachweis synaptischer Plastizität im LMAN beim Zebrafinken zeigen ebenso eigene Untersuchungen zu "perforierten Synapsen", einem Synapsentyp, der an Lernprozessen beteiligt sein soll (Jones et al., 1991). Die Quantifizierung perforierter Synapsen zeigt, daß im LMAN juveniler Tiere dieser Synapsentyp weitaus häufiger anzutreffen ist als in adulten Tieren. Interessanterweise trifft das sowohl für Männchen als auch für Weibchen zu (Nixdorf-Bergweiler, unveröffentlicht).

Die Vergrößerung neuronaler Zellkörper bei Männchen findet während der sensomotorischen Phase statt.

Mit den morphologischen Veränderungen der synaptischen Struktur sollten auch Veränderungen auf zellulärer Ebene einhergehen, sind doch für die Umbau- und Abbauprozesse der Dendritenstruktur erhöhte Stoffwechselaktivitäten und biochemische Ressourcen notwendig, die von dem Zellkörper gestellt werden müssen. Paradoxerweise nahm man aber bisher an, daß sich bei Männchen die Zellgröße im LMAN während des Gesangslernens nicht weiter verändert (Bottjer et al., 1985; Bottjer, 1987; Korsia und Bottjer, 1989). Um diesen Widerspruch aufzuklären haben wir in einer Entwicklungsstudie die Größe der neuronalen Somata im LMAN an Semidünnschnitten bestimmt. Die Abbildung 11 zeigt exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen dieser Entwicklungsstudie. Die 1 µm dicken Schnitte wurden mit Toluidineblau gefärbt. Die Ergebnisse zeigen, daß anhand klein gewählter Zeitintervalle (10 Tage) vom 10. Lebenstag ein erheblicher Wachstumszuwachs der neuronalen Zellkörper zwischen dem 40. und 60. Tag nachgewiesen werden konnte (Nixdorf-Bergweiler, 1998). Die neuronalen Somata vergrößern sich demnach vor allem in der sensomotorischen Phase des Gesangslernens. Ursache für die fehlende Entdeckung der Größenzunahme in den Zellsomata vorhergehender Studien könnten zu groß gewählte Zeitabstände sein oder auch die Wahl nicht relevanter Zeitabschnitte in der Entwicklung des LMANs. Im Vergleich zur Zellgrößenentwicklung anderer Gesangsareale wie HVC oder RA, die bereits um den 40. Tag bei Männchen adulte Somagrößen aufweisen (Konishi und Akutagawa, 1985, 1988, 1990; Herrmann und Bischof, 1986), nimmt der LMAN, der erst am 60. Tag adulte Somagrößen aufweist, einen weitaus längeren Zeitraum ein (Abb. 11). Interessanterweise sind die Zellkörper im LMAN bis zum 40. Lebenstag bei Männchen und Weibchen gleich groß. Der für Adulte bekannte Sexualdimorphismus in der Zellgröße tritt erst sehr spät um den 50. Tag in der Ontogenese auf (Nixdorf-Bergweiler, 1998). Der lange gemeinsame Entwicklungsverlauf könnte in engem Zusammenhang mit der Gedächtnisbildungsphase zu sehen sein, die in beiden Geschlechtern stattfindet, wohingegen bei Männchen der späte Wachstumsschub in der Zellgröße mit dem motorischen Gesangslernen korrelieren könnte. Da Steroidbehandlung juveniler Zebrafinkenweibchen Gesangsareale maskulinisiert (Gahr und Konishi, 1988; Konishi und Akutagawa, 1990; Schlinger und Arnold, 1991; Simpson und Vicario, 1991a; Grisham und Arnold, 1995; Jacobs et al., 1995; Grisham et al., 1997; Gong et al., 1999) und diese Tiere einen männchen-

ähnlichen Gesang hervorbringen (Gurney, 1982; Pohl-Apel und Sossinka, 1984; Simpson und Vicario, 1991b; Adkins-Regan et al., 1994), könnte die Zellgrößenentwicklung im LMAN bei Männchen auch in der hormonellen Konstitution begründet sein. Neuere Untersuchungen von White et al. (1999) bestätigen allerdings diese Hypothese nicht, da in ihren Experimenten Testosteronbehandlung juveniler Tiere keinen Einfluß auf das Zellgrößenwachstum im LMAN bei Männchen hat, wohl aber die elektrophysiologischen Eigenschaften der LMAN-Neurone verändert, indem die Entwicklung der synaptischen Transmission beschleunigt wird. Testosteronbehandlung adulter weiblicher Kanarienvögel hingegen bewirkt eine Vergrößerung der Zellkörper im LMAN, nicht nur der hormonsensitiven Zellen, sondern aller Zellen im LMAN (Brenowitz und Arnold, 1990). In einem anderen Gesangsareal, dem HVC, führt hormonelle Manipulation nicht nur zu einer Zellgrößenveränderung, sondern auch zu einer Veränderung in der Größe der Kernregion, der Anzahl und dem prozentualen Anteil androgensensitiver Zellen, sowie der Zelldichte (Johnson und Bottjer, 1993). Die Gesamtneuronenanzahl dagegen bleibt im HVC bei hormoneller Behandlung unverändert. Testosteron und/oder seine Metaboliten Estradiol und Dihydrotestosteron regulieren somit beim Kanarienvogel das HVC-Volumen, indem Projektionsneurone und androgensensitive Zellen unterschiedlich beeinflusst werden. Beim Zebrafinken, der im Gegensatz zum Kanarienvogel seinen Gesang nur einmal lernt und ihn zeitlebens beibehält, verliert Östrogen bei Weibchen seinen maskulinisierenden Einfluß auf die Zellgröße im Laufe der Entwicklung. Die Steroidsensitivität im HVC und im RA nimmt bei Weibchen bereits nach dem 35. Tag rapide ab, zu einem Zeitpunkt also, wenn die Zellkörper im HVC und RA stark zu schrumpfen beginnen (Nordeen et al., 1986; Konishi und Akutagawa, 1988; Adkins-Regan et al., 1994). Da im LMAN die neuronalen Somata der Weibchen zwischen dem 40. und 50. Tag ihre Adultwerte erreichen, könnte damit auch ihre Steroidsensitivität auf ein Minimum

Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von 1 µm Semidünnschnitten vom LMAN in Weibchen (A, B) und Männchen (C, D). Das Gewebe 30-tägiger Tiere ist in den oberen beiden Aufnahmen dargestellt (A, C), das Gewebe 60-tägiger Tiere in den beiden unteren Aufnahmen (B, D). Während in 30-Tage alten Tieren (A, C) kein Unterschied in der Zellgröße gemessen werden kann, sind in 60-tägigen (B, D) und adulten Tieren die Zellsomata bei Männchen um ein Vielfaches größer als bei Weibchen. Wie der Grafik „Somata“ weiter zu entnehmen ist, vergrößern sich bei Männchen die Zellkörper zwischen dem 40. und 60. Tag, während sie sich bei Weibchen stark verkleinern. Die Neuronendichte ($x \pm \text{SEM}$) hingegen bleibt zwischen 30 und 60 Tagen in beiden Geschlechtern konstant, verändert sich aber noch nach dem 60. Tag: Bei Weibchen nimmt die Neuronendichte zu, bei Männchen verkleinert sie sich weiter. (modifiziert nach: Nixdorf-Bergweiler, 1998)



reduziert sein. Mit dem Schrumpfen der Zellkörper bei Weibchen geht auch eine Verkleinerung in den Anschnittsflächen der Zellnuklei einher, so daß für ein Gesangsareal auf der Ebene von neuronalen Zellnuklei erstmals ein Sexualdimorphismus beschrieben werden konnte. Dieser Sexualdimorphismus ist erst am 60. Lebenstag erkennbar und im adulten Tier besonders stark ausgeprägt (Nixdorf-Bergweiler, 1998).

Wie verändert sich die Neuronendichte während des Gesangslernens?

Mit der Verkleinerung des LMAN-Volumens gehen bei Männchen bis zu 50 % der LMAN-Neurone verloren (Bottjer, 1987; Bottjer et al., 1985; Burek et al., 1991; Korsia und Bottjer, 1989; Nordeen und Nordeen, 1988). Man nimmt an, daß der größte Teil dieser Neurone zwischen dem 20. und 35. Tag verloren geht, da in diesem Zeitraum die Anzahl degenerierender Zellen weitaus höher ist als zu einem späteren Zeitpunkt (Bottjer und Sengelaub, 1989). In dem gleichen Zeitraum massiver Neuronenverluste findet ebenso eine verstärkte Innervation des LMAN aus dem thalamischen DLM statt (Johnson und Bottjer, 1992). Ob diese Situation auch auf Weibchen zutrifft ist noch völlig unbekannt. Der für adulte Tiere typische Sexualdimorphismus in der Größe der Gesangsareale HVC und RA entsteht als Folge von Zellschrumpfungsprozessen und programmierten Zelltod bei Weibchen, sowie durch Vergrößerung der Zellkörper und des axonalen Verzweigungsmusters bei Männchen (Konishi und Akutagawa, 1987; Kirn und DeVoogd, 1989). Da sich aber das LMAN-Volumen in beiden Geschlechtern verkleinert stellt sich hier die Frage, ob auch bei Weibchen eine Reduktion der Neuronendichte stattfindet (Nixdorf-Bergweiler, 1996). Ursprünglich nahm man an, daß aufgrund einer kleineren Anzahl androgensensitiver Zellen im LMAN die Neuronendichte bei Weibchen weitaus geringer ist als bei Männchen (Nottebohm und Arnold, 1976; Arnold und Saltiel, 1979; Arnold, 1980; Nordeen et al., 1986, 1987, 1992). Retrograde Markierungsexperimente schienen diese Annahme zu bestätigen, da LMAN-Neurone, die in den RA projizieren bei Weibchen im adulten Tier in geringerer Anzahl vorhanden sind als in Juvenilen (Nordeen et al., 1992). Allerdings bleiben die Verbindungen vom LMAN in den RA bei Männchen auch im erwachsenen Tier erhalten, so daß diese Aussagen so noch nicht schlüssig sind, sollte doch nach Bottjer und Sengelaub (1989) die Neuronenanzahl bei Männchen abnehmen und nicht wie von Nordeen et al., (1992) gezeigt, konstant bleiben. Eine Erklärung für den Erhalt der LMAN-RA-Projektionsneurone bei Männchen, bzw. den Verlust bei Weibchen, könnte dadurch begründet sein, daß Neurone des LMANs nicht nur zum RA

projizieren, sondern auch in die area X (Nixdorf-Bergweiler, Lips und Heinemann, 1995; Vates und Nottebohm, 1995; Kreck und Nixdorf-Bergweiler, 1999). LMAN-Neurone, die nicht in den RA projizieren, sondern nur in die area X können durch retrograde Markierungsexperimente vom RA ausgehend, die Neuronenpopulation im LMAN nur unvollständig repräsentieren. Dies könnte der Grund für die Unterschiede der an Nissl-Präparaten und Farbstoffmarkierungen gewonnen Ergebnisse sein. Diese von uns neu identifizierte LMAN - area X- Projektion wird in 2. 3. ausführlich dargestellt.

Um ein genaueres Bild über die Anzahl der Neurone im LMAN während der Gesangsentwicklungsphase zu erhalten und um zu überprüfen, ob es in der Anzahl der Neurone einen Sexualdimorphismus gibt, haben wir an Semidünnschnitten mit der stereologischen Disector-Technik (Sterio, 1984) die Anzahl der Neurone im LMAN in kleinen Zeitabständen von 10 Tagen bestimmt (Nixdorf-Bergweiler, Hintz und Kreck, zur Veröffentlichung eingereicht). Dabei konnten wir mit unserer Auswertmethode die bis zum 35. Tag stattfindenden bekannten Neuronenverluste bei den Zebrafinkenmännchen bestätigen (Bottjer et al., 1985; Nordeen und Nordeen, 1988; Bottjer und Sengelaub, 1989; Burek et al., 1991). Für Zebrafinkenweibchen kann kein eindeutiger Trend zu einer kleineren Neuronendichte festgestellt werden, weder in juvenilen Stadien noch später. Die Neuronendichte variiert bei Weibchen sehr stark bis zum 60. Tag, steigt dann aber um 51 % in erwachsenen Tieren an (Abb. 11). Auch bei Männchen findet noch nach dem 60. Tag eine Veränderung in der Neuronendichte statt, da adulte Männchen 41 % weniger Neurone pro Volumeneinheit aufweisen als 60-tägige. Aufgrund der erhöhten Neuronendichte bei Weibchen und einer Verminderung bei Männchen ist die Neuronendichte des LMANs in adulten Weibchen fast viermal so hoch wie bei adulten Männchen (Abb. 11). Da die LMAN-Volumen sich zwischen den Geschlechtern kaum unterscheiden (Nixdorf-Bergweiler, 1996), ergibt sich für die Gesamtanzahl der Neurone im LMAN ein ähnliches Bild wie für die Neuronendichte. Für den LMAN wurde somit ein Sexualdimorphismus mit umgekehrten Vorzeichen aufgezeigt: im LMAN bei Weibchen gibt es weitaus mehr Neurone als bei Männchen. Wie läßt sich die erhöhte Neuronendichte bei Weibchen erklären? Wo kommen die Neurone her? Da im Telencephalon bei Vögeln auch noch im erwachsenen Tier Neubildung von Nervenzellen stattfindet, könnten diese Zellen neugebildete Nervenzellen darstellen (Goldman, 1983; Kirn und DeVoogd, 1989). Neurogenese findet aber vor allem im HVC und in der area X, nicht aber im LMAN statt (Nottebohm, 1993). Für den LMAN ist der

Anteil an neugebildeten Zellen nach dem 20. Lebenstag bei Männchen mit 0.8 % verschwindend gering (Nordeen und Nordeen, 1988). Für Weibchen liegen keine Daten vor. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß es sich bei der erhöhten Neuronendichte um neugebildete Nervenzellen handelt. Eher könnte es sich um Neurone handeln, die aus der unmittelbaren Umgebung in den LMAN hineingewandert sind und ihren Phänotyp derart verändert haben, daß sie von den „ursprünglichen“ LMAN-Neuronen im Nissl-Präparat nicht mehr zu unterscheiden sind. Die bei Männchen nachgewiesene Reduzierung in der Neuronendichte könnte durch selektiven Zelltod erklärt werden, wie er für juvenile Stadien im LMAN, sowie auch bei Weibchen in den Gesangsarealen HVC, area X und RA aufgezeigt wurde (Konishi und Akutagawa, 1985; Bottjer und Sengelaub, 1989; Kirn und DeVoogd, 1989; Burek und Oppenheim, 1996; Burek et al., 1997).

Läßt sich der auf zellulärer Ebene nachgewiesene Sexualdimorphismus auch auf der Ebene von Nukleoli nachweisen?

In der Entwicklungsstudie zur Bestimmung von Neuronendichten im LMAN wurde der Nukleolus als Markierungseinheit für das Vorhandensein eines Neurons gewählt. Dies ist in der Wissenschaft eine allgemein übliche Methode für die Bestimmung von Neuronendichten (Tramontin et al., 1998). Interessanterweise schienen Nukleoli von LMAN-Neuronen nicht in allen Altersstufen in ihrem morphologischen Erscheinungsbild gleich zu sein. Auffallend war, daß manche Nukleoli "ringförmig" waren, bzw. "durchlöchert" erschienen, andere wiederum eine recht kompakte Struktur aufwiesen. Diese auf der lichtmikroskopischen Ebene schon recht gut erkennbaren Unterschiede konnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden (Abb. 12, *obere und mittlere Abbildung*). Da der Begriff „ringförmig“ nur für die Anschnittsfläche von Nukleoli zutrifft, nicht aber für die gesamte Struktur in räumlicher Darstellung, habe ich den Begriff CLA (central light area)-Nukleoli eingeführt: also Nukleoli, die eine helle centrale Region aufwiesen (Nixdorf-Bergweiler, 1997). Das Phänomen der CLA-Nukleoli im LMAN wurde in einer Entwicklungsstudie systematisch untersucht. Bei der Quantifizierung der CLA-Nukleoli zeigte sich, daß in juvenilen Stadien sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen ca. 10 % der Nukleoli zum CLA-Typ gehören (Abb. 12, *untere Abbildung*). In adulten Tieren dagegen sind bei Männchen mehr als 35 % der Nukleoli CLA-Nukleoli, bei Weibchen hingegen liegt der prozentuale Anteil unverändert bei ca. 10 % (Nixdorf-Bergweiler, 1997). Das verstärkte Vorkommen dieses spezifischen Nukleolustyps

bei Männchen erfolgt in einer progressiven Entwicklung: zwischen dem 20. und 50. Lebenstag nimmt der prozentuale Anteil an CLA-Nukleoli um das 3-fache zu und erhöht sich noch einmal signifikant um 72 % bis zum 60. Tag, an dem der Adultwert erreicht wird. Wir fragten uns, ob der spezifische CLA-Nukleolustyp auch in anderen Gesangsarealen in dieser Form repräsentiert ist. In meiner Arbeitsgruppe zeigte Claudia Freyer in ihrer Studienjahresarbeit (1998), daß im Gesangkern RA adulter Männchen es lediglich 1.6 % und im HVC 2.8 % CLA-Nukleoli gibt, also ein weitaus geringeres Vorkommen als im LMAN. Untersuchungen der area X, sowie zwei visueller Regionen, dem Ectostriatum und dem Nucleus Rotundus, weisen ebenso ein nur sehr geringes Vorkommen dieses speziellen Nukleolustyps auf. Somit nimmt der LMAN bzgl. CLA-Nukleoli eine Sonderstellung ein. Die Nukleoli im LMAN unterscheiden sich zwischen den Geschlechtern aber nicht nur in ihrer cytomorphologischen Form, sondern auch in ihrer Größe, da bei Männchen die Anschnittsfläche von Nukleoli bis zu 50 % größer sind als bei Weibchen und dieser Unterschied sowohl in juvenilen als auch in adulten Tieren auftritt (Nixdorf-Bergweiler, 1997). Mit diesem Befund wurde erstmalig ein Sexualdimorphismus auf der Ebene von Nukleoli in der Literatur nachgewiesen. Auch im RA sind die Nukleoli bei Männchen weitaus

Abb. 12: Darstellung von Geschlechtsunterschieden im LMAN auf der Ebene von Nucleoli. *Obere Abbildung:* Repräsentative hochauflösende lichtmikroskopische Aufnahme eines angeschnittenen Neurons mit Nucleoplasma und Nucleolus im 1 µm Semidünnschnitt eines adulten Zebrafinkenmännchens (x100 Öl). Im Nucleoplasma (Bildmitte) befindet sich in unmittelbarer Nähe der Kernmembran ein Nucleolus. Dieser Nucleolus ist durch eine zentral gelegene helle Region (central light area) charakterisiert und wird daher in die Gruppe der CLA-Nucleoli eingeordnet (Nixdorf-Bergweiler, 1997). Zahlreiche längs- und quergeschnittene Axone, typisch für adultes LMAN-Gewebe, sind ebenso auf der Aufnahme zu erkennen. *Mittlere Abbildung:* Die beiden nebeneinander angeordneten elektronenmikroskopischen Abbildungen repräsentieren jeweils einen CLA-Nucleolus auf ultrastruktureller Ebene bei Weibchen (links) und bei Männchen (rechts). Die Größe von LMAN-Nucleoli ist sexualdimorph: Männchen haben signifikant größere Nucleoli als Weibchen. Die CLA-Nucleoli sind in ihrer maximalen Ausdehnung angeschnitten und einige ihrer strukturellen Komponenten exemplarisch markiert. Zu den strukturellen Komponenten des Nucleolus gehören die granuläre (G) und die dichte fibrilläre Komponente (F), sowie fibrilläre Zentren (Fc), wie auch in vielen Fällen eine Vakuole (V). Im allgemeinen ist ein fibrilläres Zentrum von dichten Fibrillen umgeben. *Untere Abbildung:* Prozentuales Vorkommen von CLA-Nucleoli im LMAN während der Entwicklung dargestellt für Männchen und Weibchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern sind gekennzeichnet (*p ≤ 0.05; ***p ≤ 0.001).

(modifiziert nach: Nixdorf-Bergweiler, 1997)

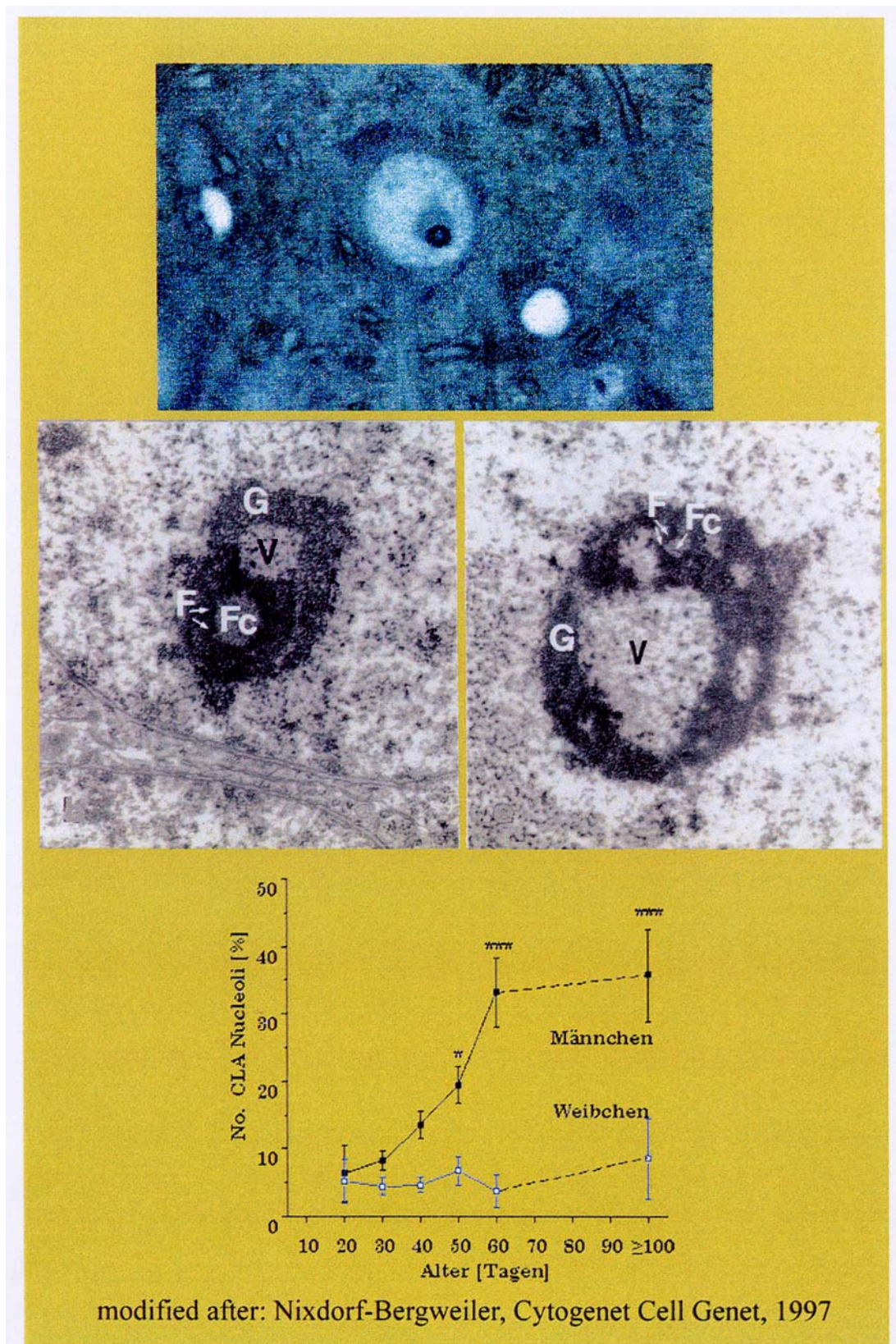


Abb. 12: Darstellung von Geschlechtsunterschieden im LMAN auf der Ebene von Nucleoli.

größer als bei Weibchen (Freyer, Studienjahresarbeit 1998; Freyer und Nixdorf-Bergweiler, 1998). Wir vermuten, daß auch in anderen sexualdimorphen Systemen wie z.B. dem präoptischen anterioren hypothalamischen Areal (POA/AH) oder dem Nucleus bulbocavernosus (SNB), also Systemen, die bei Säugern für die Steuerung von Sexualverhalten eine Rolle spielen (Cherry et al., 1992; Breedlove und Arnold, 1980), Nukleoli sich in ihrer Größe unterscheiden. Dieses Phänomen wurde bisher jedoch nicht untersucht.

Die Größenunterschiede auf nukleolärer Ebene könnten Unterschiede in der Protein-Biosynthese reflektieren, spielt doch der Nukleolus eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Ribosomen. Transkription ribosomaler RNA-Gene wie auch die Weiterverarbeitung ihrer Transkripte mit ribosomalen und nicht-ribosomalen Proteinen, all diese Prozesse laufen wohlkoordiniert in definierten Regionen des Nukleolus ab (Goessens, 1984; Scheer und Benavente, 1990). Somit steht also der Nukleolus in enger Beziehung zur Proteinbiosynthese einer Zelle und es ist anzunehmen, daß seine Morphologie den Proteinsynthesestatus eines Neurons widerspiegeln kann, wie es für nicht-neuronale Zellen bereits vielfach nachgewiesen wurde (Underwood, 1990). Für neuronale Zellen gibt es nur wenige Beispiele. Unter anderem ist bekannt, daß Purkinje-Zellen im Cerebellum eines Winterschläfers (*Erinaceus europaeus* L.) saisonale Größenunterschiede aufweisen, da während Hibernation Purkinjezell-Nukleoli weitaus kleiner sind als unter Aktivitätsbedingungen (Giacometti et al., 1989). Inwiefern diese saisonalen Effekte auch einen Einfluß auf Nukleoli in Gesangsarealen, insbesondere bei Kanarienvögeln haben, muß noch gezeigt werden.

Ein weiteres Merkmal des Nukleolus, das physiologische Eigenschaften von Zellen auf zytologischer Ebene widerspiegelt, ist die Verlagerung des Nukleolus in die Peripherie des Nucleus, ein Charakteristikum, das in der Literatur unter verschiedenen experimentellen und pathologischen Einflüssen beschrieben wird (Kamel et al., 1990). Um mehr Information über die Besonderheit der Nukleoli im LMAN zu erfahren, hat Claudia Freyer (Studienjahresarbeit, 1998) die Lage des Nukleolus innerhalb eines Nucleus in Neuronen des LMANs, sowie vergleichend die Exzentrizität von Nukleoli in dem Projektionsgebiet des LMAN, dem RA, bestimmt. Die Berechnung der prozentualen Exzentrizität von Nukleoli im Nucleus wurde in Analogie zur prozentualen Exzentrizität vom Nucleus im Soma nach Born, Carman und Rubel (1987) ermittelt. Dabei zeigte sie, dass in

adulten Zebrafinkenmännchen im prämotorischen RA die höchste prozentuale Exzentrizität (52.2 %) auftritt und im LMAN mit 40.5 % ein signifikant geringerer Wert vorlag. Die Werte für die prozentuale Exzentrizität in adulten Weibchen im LMAN (46.8 %) und RA (44.8 %) unterschieden sich dagegen nicht. In juvenilen Tieren (20d) lag die prozentuale Exzentrizität im RA bei nur 37.7 % und war somit signifikant kleiner als in adulten Tieren. Demnach wandert der Nukleolus in RA-Neuronen während der Entwicklung in die Nähe zur Kernmembran hin. Uns interessierte nun, zu welchem Zeitpunkt in der Gesangsentwicklung der Adultwert erreicht wird. Bei der Untersuchung weiterer Alterstadien zeigte sich, daß es zwischen dem 20. und 30. Tag einen signifikanten Anstieg in der prozentualen Exzentrizität gibt, also noch vor dem Einwandern der HVC-Neurone in den RA. Dieser Wert entspricht jedoch noch nicht dem Adultwert. Zwischen dem 30. und 60. Tag verändert sich die prozentuale Exzentrizität im RA nicht, steigt dann aber noch einmal nach dem 60. Tag signifikant an. Diese Befunde sind insofern interessant, als im RA auch noch nach dem 60. Tag zelluläre Veränderungen stattfinden, obwohl die Zellkörper bereits mit 40 Tagen und das RA-Volumen um den 50. Tag ihre Adultwerte erreicht haben (Konishi und Akutagawa, 1985, 1988, 1990; Nixdorf-Bergweiler, 1996; Bottjer et al., 1986). Da zahlreichen Experimente das Vorhandensein exzentrischer Nukleoli mit größtenteils Kontakt zur Kernmembran in hauptsächlich regenerierenden Zellen belegen, also in Zellen mit vermutlich erhöhter Stoffwechselaktivität und somit auch gesteigerter RNA-Syntheserate, könnte aufgrund der hohen Exzentrizität im RA entsprechend eine hohe Aktivität dieses Kernes im adulten Tier gefordert werden. Diese Interpretation deckt sich auch mit der Tatsache, daß die hohe Exzentrizität in 20-tägigen Männchen noch nicht vorhanden war und sich erst während der sensomotorischen Phase bis ins Erwachsenenalter (Ende der Gesangsentwicklung) ausbildet.

*Der Anteil myelinisierter Axone im LMAN nimmt in beiden Geschlechtern den gleichen
Entwicklungsverlauf.*

Da für den LMAN bei Männchen regressive Entwicklungsprozesse in der Volumengröße, dem Auftreten dendritischer Spines, der Synapsendichte, sowie der Zelldichte aufgezeigt wurden, andererseits die Zellkörper sich noch sehr spät in der Ontogenese vergrößerten, stellte sich die Frage, in welchem Zeitraum Myelinisierung bei der Ausdifferenzierung des neuronalen Netzwerks im LMAN eine Rolle spielt. Dabei ist die Myelinisierung des LMAN bei Weibchen von besonderem Interesse. Generell spielen Myelinisierungsprozesse eine

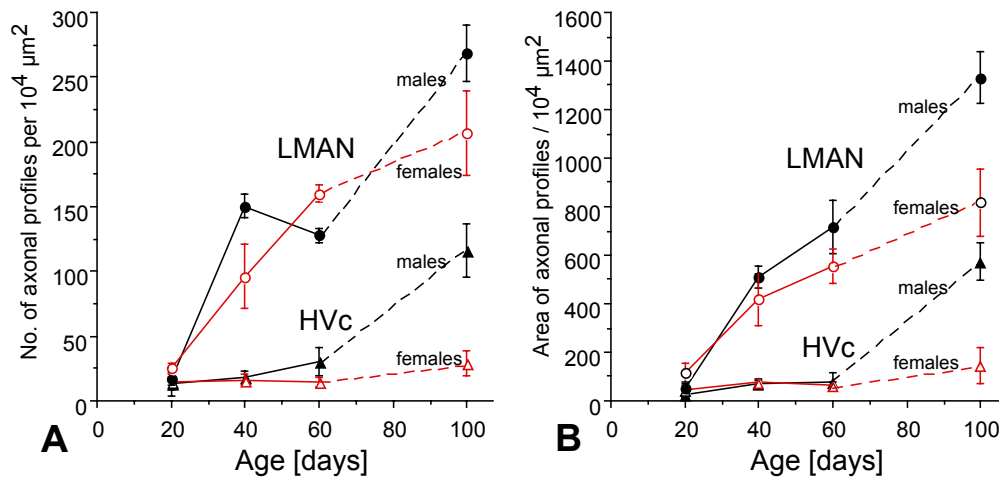


Abb. 13: Entwicklung myelinisierter Axonprofile im LMAN und HVC. (A) Die Anzahl myelinisierter Axon-Anschnittsflächen pro Flächeneinheit erhöht sich während der Entwicklung im LMAN in beiden Geschlechtern. Im HVC dagegen findet nur bei Männchen eine Zunahme statt. (B) Die Gesamtfläche axonaler Profile, gemessen in Quadratmicrometer pro Flächeneinheit, zeigt eine ähnliche Entwicklung wie die Anzahl.

(aus: V. Hintz, Diplomarbeit, 1996)

wichtige Rolle beim Aufbau neuronaler Verbindungen und eine zum größten Teil abgeschlossene Myelinisierung einer Kernregion kann als Indiz für die Einschränkung neuronaler Plastizität gewertet werden (Wolff, 1981). Einen Zusammenhang zwischen Myelinisierung, funktionellen Eigenschaften bestimmter Gehirnareale sowie spezifischer Verhaltensabläufe wurde schon seit langem für verschiedene Systeme gefordert (van der Knaap, 1991). Für das Gesangssystem liegen einige wenige Daten zur Myelinisierung vor, aber eine detaillierte Analyse, insbesondere ein Vergleich der Myelinisierung zwischen den Geschlechtern wurde bisher nicht durchgeführt (Herrmann und Bischof, 1986; Güttinger et al., 1993; Stocker et al., 1994). Daher hat Viola Hintz in einer Diplomarbeit (1996) bei mir die Entwicklung axonaler Profile im LMAN bei Männchen und Weibchen anhand von Semidünnschnitten ausgewertet und zum Vergleich eine weitere Gesangsregion, den HVC, herangezogen (Abb. 13). Entsprechend der Volumenentwicklung im LMAN, die in beiden Geschlechtern recht ähnlich abläuft (Nixdorf-Bergweiler, 1996), gibt es in den von uns gewählten Parameter zur Quantifizierung von Myelinisierungsprozesse keine Unterschiede im LMAN zwischen Männchen und Weibchen, weder in juvenilen, noch in adulten Tieren. Während für den LMAN bereits in den ersten 40 Lebenstagen signifikante Anstiege in der Myelinisierung gemessen werden können, findet im HVC meßbare Myelinisierung erst nach

dem 60. Lebenstag statt und das auch nur bei Männchen. Bei Weibchen hingegen bleibt im HVC die Myelinisierung während der gesamten Entwicklung auf relativ niedrigem Niveau (Hintz und Nixdorf-Bergweiler, 1997). Die von uns nachgewiesene frühe Myelinisierung im LMAN, die noch vor der Myelinisierung im HVC einsetzt, steht im Einklang mit den Entwicklungsbefunden zum Aufbau der Konnektivität der Gesangskerne der anterioren Vorderhirnbahn, die zeitlich vor der Innervation des HVCs mit dem RA stattfindet (Konishi und Agutagawa, 1985; Mooney und Rao, 1994). Der lange Entwicklungsprozess der Myelinisierung ist ein weiteres Indiz für die langandauernde neuronale Entwicklung in den Gesangkernen sowohl im LMAN als auch im HVC. Für den LMAN scheint eine erhöhte Myelinisierung mit einer Reduktion an Synapsen einherzugehen, womit nach Wolff (1981) neuronale Plastizität letztendlich eingeschränkt wird.

2. 3. Aufklärung neuronaler Verbindungen *in vivo* und am *in vitro* Hirnschnittpräparat weisen neue Projektionen auf.

Ursprünglich nahm man an, daß das Gesangssystem neuronal von in Serie geschalteten Gesangkernen repräsentiert wird. Mit der Entdeckung der anterioren Vorderhirnbahn (Okuhata und Saito, 1987; Bottjer et al., 1989), sowie der Einbindung eng angrenzender Regionen, die Gesangszentren unmittelbar aufliegen und topographisch in entsprechende angrenzende Regionen weiterer Gesangszentren projizieren (Johnson et al., 1995; Vates et al., 1996; Mello et al., 1998) und neuer mehrfach repräsentierter Verbindungen zwischen bereits bekannten Gesangsarealen (Wild, 1993a; Vates und Nottebohm, 1995; Foster et al., 1997), sowie die Entdeckung neuer Kernregionen, die ebenso in das Gesangssystem eingebunden werden müssen (Vicario, 1993; Wild, 1993b; Vates et al., 1996; Foster et al., 1997), erweist sich das Gesangssystem als ein komplex aufgebautes neuronales System, das in seinen Grundzügen den thalamo-corticalen Schaltkreisen der Säuger ähnelt (Vates et al., 1997).

Innerhalb der AFP gibt es bei Männchen eine rekursive Schleife, die Information vom LMAN zurück in den Lobus olfactorius projiziert.

Zur Aufklärung neuronaler Verbindungen haben wir mit elektrophysiologischen Methoden am *in vitro* Hirnschnittpräparat in adulten Zebrafinkenmännchen die Verbindung des LMAN mit seiner unmittelbaren Nachbarschaft untersucht. Dabei konnte Mario Lips in seiner bei mir

durchgeführten Diplomarbeit (1994) im Labor von Professor Heinemann, Neurone im LMAN anhand antidromer Spikeantworten identifizieren, die ihr axonales Verzweigungsmuster in die area X projizieren (Abb. 14). Diese Projektion konnten wir durch intrazelluläre Zellfüllungen

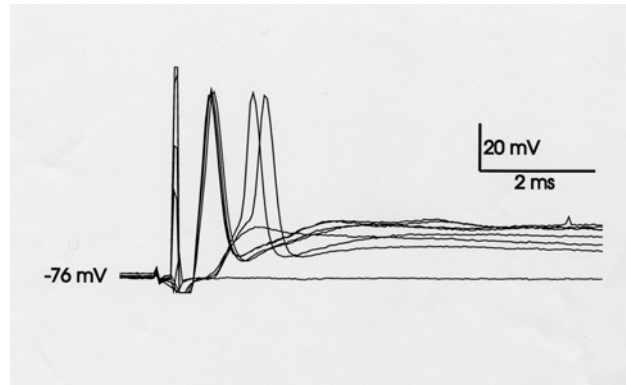


Abb. 14: Intrazelluläre Ableitungen von einem LMAN-Neuron während area X-Stimulation am *in vitro* Hirnschnittpräparat. Niederschwellige Reize (2 V) erzeugen exzitatorische postsynaptische Potentiale, da das Fasersystem DLM-LMAN, das teilweise auch durch die area X zieht, aktiviert wird. Höhere Reizstärken (5 bis 8 V) evozieren antidrome Aktionspotentiale (die Latenz zwischen Reiz und Antwortreaktion beträgt weniger als 1 ms) und belegen somit elektrophysiologisch eine Projektion vom LMAN zur area X.

(aus: Nixdorf-Bergweiler, Lips und Heinemann, 1995)

mit Biocytin (Abb. 15), sowie extrazellulärer Applikation von dem fluoreszierenden Tracer Fluoro Ruby (Abb. 16) *in vitro* verifizieren (Nixdorf-Bergweiler, Lips und Heinemann, 1995). Ein solches Biocytin-markiertes Neuron habe ich mit seinem Dendritenbaum und axonalen Verzweigungsmuster rekonstruiert (Abb. 15, *unten*) und seine Lage im LMAN schematisch dargestellt (Abb. 15, *oben*). Viele LMAN-Neurone, die bekanntermaßen in den RA projizieren (Bottjer et al., 1989), bilden ebenso Kollaterale aus, die zur area X im Lobus parolfactorius ziehen. Zwischen dem LMAN und der area X ist die Projektion topographisch organisiert (Vates und Nottebohm, 1995; G. Kreck, Diplomarbeit 1998). Diese Topographie ist bereits in juvenilen Tieren vorhanden, im Gegensatz zur Projektion in den RA, die erst im Laufe der Gesangsentwicklung ihre topographischen Eigenschaften erhält (Iyengar et al., 1999). Unsere elektrophysiologischen Befunde zeigen, daß sich LMAN-Neurone entsprechend ihrer Spikefrequenz bei stärkerer und länger anhaltender Depolarisation durch eine positive Strominjektion in funktionell verschiedene Klassen einteilen lassen. LMAN-Neurone zeigten Feuerraten, die nach einer anfänglich hohen Frequenz zu einer niederen Frequenz wechselten (regular-spiking cells) oder hohe Feuerraten, die über den gesamten

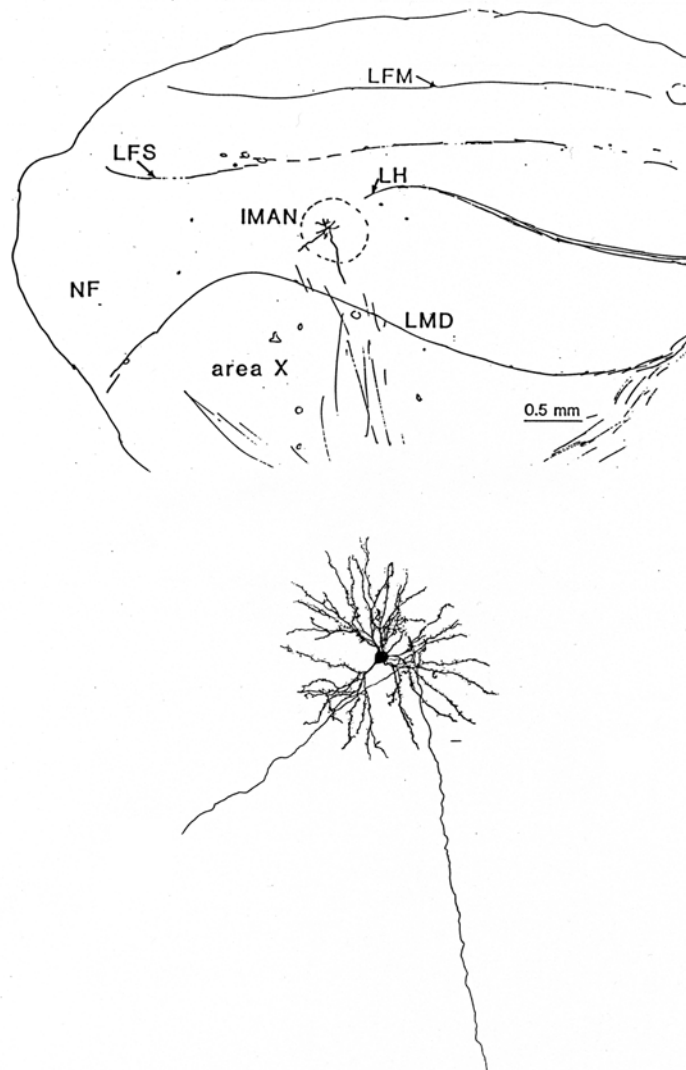


Abb. 15: Biocytin-gefüllte Zelle im LMAN. Ein Biocytin-gefülltes Neuron, dessen Axon sich in unmittelbarer Nähe vom Zellkörper in zwei Kollaterale aufspaltet, wobei ein Teil in Richtung area X zieht und die andere Abzweigung in das frontale Neostriatum verläuft, ist anhand einer Camera-Lucida-Zeichnung durch Rekonstruktion dargestellt. Morphologisch läßt sich das abgebildete Neuron dem spinereichen Neuronentyp zuordnen. Dieser Neuronentyp bildet den größten Teil der Neuronenpopulation im LMAN.

Zeitraum der Strominjektion kaum eine Frequenzveränderung aufwiesen (fast-spiking cell). Bursterzellen mit hochfrequenten Spikes zu Beginn einer Depolarisation durch Strominjektion, wie sie z.B. im HVC nachgewiesen wurden (Lewicki, 1996), wurden im LMAN nicht identifiziert. Viele Zellen zeigten interneuronalen Charakter.

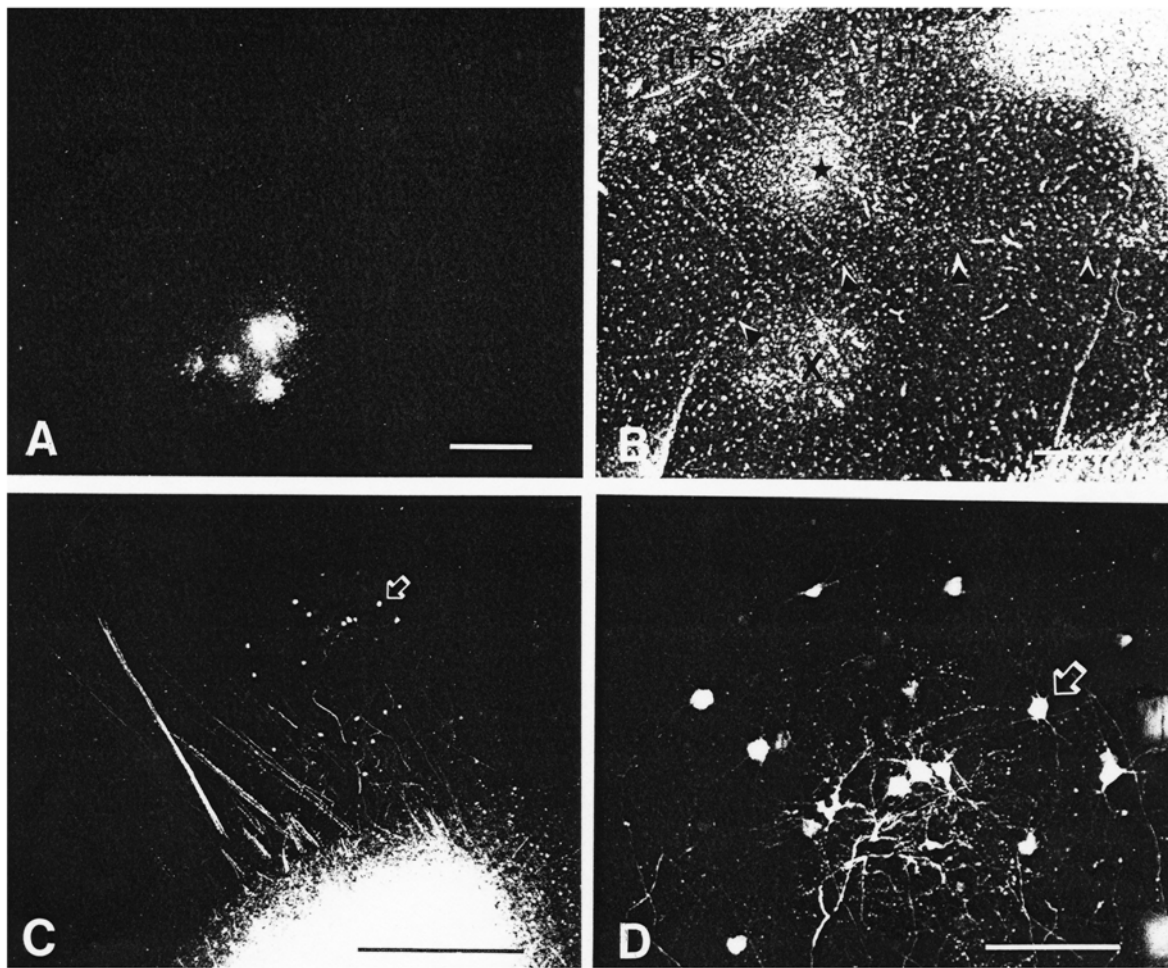


Abb. 16: Fluoreszierende retrograd markierte Neurone im LMAN, die in die area X projizieren. (A) zeigt die Applikationsstelle des Tracers (Fluoro Ruby) in der area X bei schwacher Vergrößerung. Einzelne fluoreszierende Neurone sind bei dieser Vergrößerung noch nicht gut erkennbar. In (B) ist zur besseren Orientierung die gleiche Region des Fluoreszenzbildes aus (A) im Dunkelfeld dargestellt. Auch in einem nicht-gefärbten Schnitt lassen sich mit dem Dunkelfeld spezifische Gehirnstrukturen recht gut erkennen: area X (X) und LMAN (*), sowie auch ein kleiner Teil der Lamina hyperstriatica (LH) und der Lamina frontalis superior (LFS) sind gekennzeichnet. Schwarz-weiße Pfeilspitzen zeigen auf die Lamina medullaris dorsalis (LMD), die sich zwischen area X und LMAN schiebt. Im Fluoreszenzbild (c) sind erst bei höherer Vergrößerung markierte Neurone im LMAN erkennbar. Eines dieser Neurone wurde exemplarisch mit einem Pfeil gekennzeichnet und ist in (D) vergrößert dargestellt. Bei den Präparaten handelt es sich um Gefrierschnitte. Dorsal ist oben und rostral liegt links im Präparat. In (A), (B) und (C) beträgt der Vergrößerungsmaßstab 500 μm , in (D) beträgt er 100 μm .
(aus: Nixdorf-Bergweiler, Lips und Heinemann, 1995)

Gibt es auch bei Weibchen eine rekursive Schleife innerhalb der AFP?

Um der Frage nachzugehen, ob auch in weiblichen Tieren wie bei Männchen eine Projektion aus dem LMAN in den Lobus parolfactorius zieht, hat Gunter Kreck in seiner Diplomarbeit (1998) Farbstoffapplikationen am *in vitro* Hirnschnittpräparat bei Weibchen in den Lobus parolfactorius durchgeführt. In der Abbildung 17 ist ein solcher 400 µm dicker Hirnschnitt im Frischpräparat zu sehen. Der Lobus parolfactorius, sowie der LMAN ist gut zu erkennen.

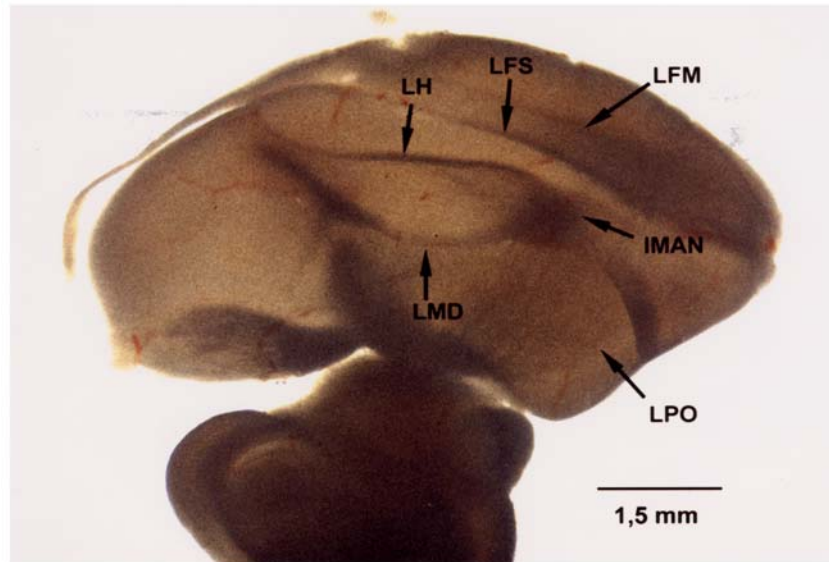


Abb. 17: Aufsicht auf einen 400 µm dicken nativen ungefärbten Vibratomschnitt (Lateralschnitt) von einem Zebrafinkengehirn eines adulten Weibchens. Der LMAN im anterioren Neostriatum ist auch in Weibchen recht gut erkennbar. Eine area X wurde für Weibchen bisher nicht beschrieben. (aus: G. Kreck, Diplomarbeit 1998)

Herr Kreck nutzte die Möglichkeit mit dem Nanoliterinjektor kleinste Farbstoffmengen extrazellulär in den Lobus olfactorius am Hirnschnitt zu applizieren, um retrograd Neurone im LMAN aufzuzeigen. Parallel dazu wurden auch Farbstoffapplikationen am Hirnschnittpräparat bei Männchen durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Fluoro Ruby und Oregon Green eingesetzt, als nicht-fluoreszierenden Farbstoffe dienten biotinylierte Dextran Amine und Choleratoxin B. Mit den Farbstoffapplikationen konnten wir zeigen, daß auch bei Weibchen eine Projektion in den Lobus parolfactorius existiert, und diese Region der area X bei Männchen entspricht. Neben den eindeutig markierten Neuronen im LMAN, eines davon ist in der Abbildung 18 dargestellt, waren auch viele Axone mit axonalen Schwellungen markiert, die sehr wahrscheinlich Axone der Projektionsneurone aus dem DLM darstellen. Das bedeutet, daß auch bei Weibchen die Verbindungen vom DLM zum LMAN

derart durch den LPO ziehen, wie es bei Männchen beobachtet wird. Stereotaktische Injektionen in den LMAN konnten retrograd neuronale Zellkörper im thalamischen Nucleus DLM markieren, womit wir eine Projektion des DLMs zum LMAN auch bei Weibchen nachgewiesen haben (Kreck und Nixdorf-Bergweiler, 1999). Bisher liegen aber keine Daten

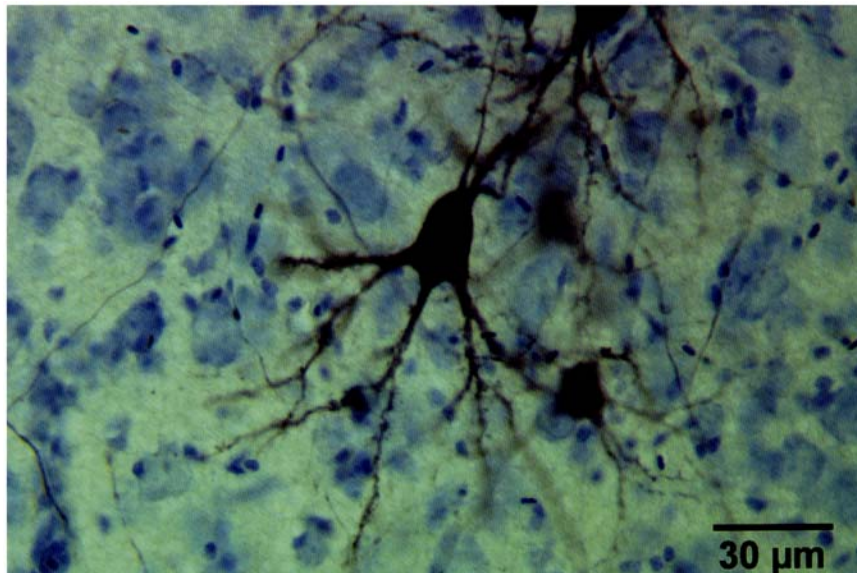


Abb. 18: Repräsentatives BDA-markiertes Neuron im LMAN, das in eine der area X äquivalenten Region im Lobus parolfactorius bei Weibchen projiziert. Viele dieser markierten Neurone weisen Axonkollaterale auf, wie sie auch bei Männchen beobachtet wurden. Mit diesen Befunden am in vitro Hirnschnittpräparat konnte auch bei Weibchen erstmals eine Projektion vom LMAN in den Lobus parolfactorius nachgewiesen werden.

(aus: G. Kreck, Diplomarbeit 1998)

vor, ob diese durchziehenden Axone auch synaptische Kontakte mit dem LPO-Areal ausbilden. Es wäre gut möglich, daß z.B. „en passant Synapsen“ ihre Information aus dem DLM bereits schon auf diese Weise an Neurone im LPO abgeben, noch bevor der LMAN, das Zielgebiet des DLMs, seine Information wiederum in den LPO abgibt. Damit könnte Information aus dem RA, der kleine axonale Verbindungen in den DLM sendet (Wild, 1993a), schneller und ohne eine weitere Verarbeitungsstufe, also ohne LMAN, motorische Information in den LPO einfließen. Interessanterweise wurden auch durchziehende Fasern aus dem LMAN zum RA im HVC entdeckt (Nixdorf-Bergweiler, Lips und Heinemann, 1995). Auch hier stellt sich die Frage nach möglichen „en passant“ Synapsen, was elektronenmikroskopisch in Verbindung mit Farbstoffapplikation nachgewiesen werden könnte. Die Entdeckung von rekursiven Schleifen beim Vogel unterstützen die

Betrachtungsweise der telencephalen Projektionen als thalamo-corticales Projektionssystem (Iyengar et al., 199; Bottjer und Johnson, 1997; Vates et al., 1997; Waldman und Güntürkün, 1993).

Die Umrisse des LMAN im Nissl-Präparat (Bottjer et al., 1989; Nixdorf-Bergweiler, 1996) entsprechen nicht immer eindeutig der Größe der LMAN-Region, wie sie mit retrograder Markierung über den RA erzielt wird (Nordeen et al., 1992) oder über ihr afferentes Innervationsgebiet (Johnson und Bottjer, 1992). Mit Farbstoffapplikationen direkt in den LMAN im Hirnschnittpräparat, konnten die Grenzen des LMANs bei Männchen und Weibchen markiert werden. Hierbei zeigte sich, daß die Umrisse des LMAN zwischen den Geschlechtern recht ähnlich sind und somit der im Nissl-Präparat definierten LMAN-Region entspricht (Nixdorf-Bergweiler, 1996; Kreck und Nixdorf-Bergweiler, 1999). Stereotaktische Farbstoffinjektionen bei Weibchen in den RA in vivo markieren ebenso gleichermaßen den LMAN (Kreck und Nixdorf-Bergweiler, 1999).

Elektrophysiologische Identifizierung afferenter und efferenter Projektionen im RA bei Männchen weisen neue Verbindungen auf.

Neurone im LMAN projizieren bekanntermaßen in den RA, der ebenso Eingänge vom HVC erhält (Bottjer et al, 1989; Herrmann und Arnold, 1991b). Die Projektion vom LMAN in den RA ist topographisch organisiert und erreicht den RA auf seiner lateral gelegenen Seite. Dabei innervieren Axone aus der lateralen Region des LMAN den ventromediale RA, der dorsale RA erhält Afferenzen aus der medial gelegenen LMAN-Region (Johnson et al., 1995). Diese Topographie bildet sich zwischen dem 20. und 35. Lebenstag aus (Iyengar et al., 1999). Auch der prämotorische Ausgang zum Nucleus Hypoglossus ist bei Männchen topographisch organisiert (Vicario, 1991), wie auch die Projektion der Motoneurone auf die verschiedenen Muskelgruppen des Syrinx (Vicario und Nottebohm, 1988; Ruan und Suthers, 1996). So könnte bereits im RA eine myotopische Organisation ausgebildet sein. In einer Studienjahresarbeit von Svenja Steinfelder (2000) konnten die Projektionen vom RA in den nXIIts anhand stereotaktischer Injektionen verifiziert werden. Der RA innerviert im Hirnstamm aber nicht nur den nXII, sondern auch den Nucleus Retroambigualis und N. Ambigualis, die an der Koordination der Atmung beteiligt sind (Vicario, 1993; Wild, 1993b). Eine andere Projektion, die ihren Ausgang in einer schmalen dorsal gelegenen RA-Region

nimmt, zieht in das Mittelhirn zum Nucleus Dorsomedialis, der zum Nucleus Intercollicularis-Komplex gehört (Nottebohm et al., 1976; Wild, 1993a). Ein weiteres Projektionsgebiet stellt wiederum der DLM dar, der seine Information in die anteriore Vorderhirnbahn einspeist. Diese Projektion könnte, wie bereits erwähnt, eine interne Rückkopplungsschleife während des Singens darstellen, die besonders in der Zeit der motorischen Gesangseinübung eine wichtige Rolle einnimmt. Der RA als prämotorischer Kern weist somit vier verschiedene Zielgebiete auf. Die Axone des RAs verlassen dabei die Kernregion an der ventralen Seite, wobei die Axone sich dem Tractus Occipito-Mesencephalicus anschließen. Wir haben uns gefragt, ob es neben diesen den RA verlassenen Faserkomplex auch noch andere Ausgangsregionen für den RA gibt. Eingangsinformation bekommen die RA-Neurone sowohl vom HVC als auch vom LMAN. Da die HVC-Axone von dorsal in den RA einlaufen, die LMAN-Axone von lateral (Bottjer et al., 1989; Mooney und Konishi, 1991), fragten wir uns, ob auch in der ventralen Region HVC-Afferenzen lokalisiert sind, oder diese nur auf die weiter dorsal gelegene RA-Region treffen. Neben diesem Interesse an dem Projektionsmuster wollten wir auch mehr über die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser in der ventralen Region gelegenen Projektionsneurone erfahren. Diese Neurone spielen sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Umsetzung der vom HVC einlaufenden Information der Muster-generierung für Gesangssequenzen (Wild, 1997).

In einem Kooperationsprojekt mit Prof. Heinemann und Dmitry Sandakov wurden am *in vitro* Hirnschnittpräparat mit elektrophysiologische Methoden die Ein- und Ausgangsbeziehungen in der ventralen Region des RAs überprüft und die intrinsischen und extrinsischen Eigenschaften dieser Neurone bestimmt (Abb. 19). Bei der Hirnschnittpräparation wurden im Gegensatz zu den sonst benutzten Lateralschnitten, Querschnitte benutzt, um die Eingänge vom HVC und vom LMAN getrennt vorliegen zu haben (Mooney und Konishi, 1991; Kubota und Saito, 1991b). Da die Afferenzen zum RA topographisch organisiert sind, war es wichtig, immer aus dem gleichen Areal abzuleiten. Gute stabile intrazelluläre Ableitungen werden für die Stimulationsexperimente, bei denen beide Fasersysteme (HVC-RA-Projektion und LMAN-RA-Projektion) getrennt stimuliert werden, vorausgesetzt. Solche stabilen intrazellulären Ableitungen konnten zuverlässig in der ventromedialen Region des RA erzielt werden. Die Abbildung 19 zeigt erregende postsynaptische Potentiale bei Stimulation von HVC-RA Fasern ('HVC') und bei Stimulation von LMAN-RA Fasern ('LMAN'). Die beiden Antwortreaktionen unterscheiden sich in ihrem Anstiegsverlauf, sowie in der Amplitude.

Werden beide Fasersysteme gleichzeitig gereizt, so kommt es zu einer erhöhten Antwortreaktion ('IMAN and HVC').

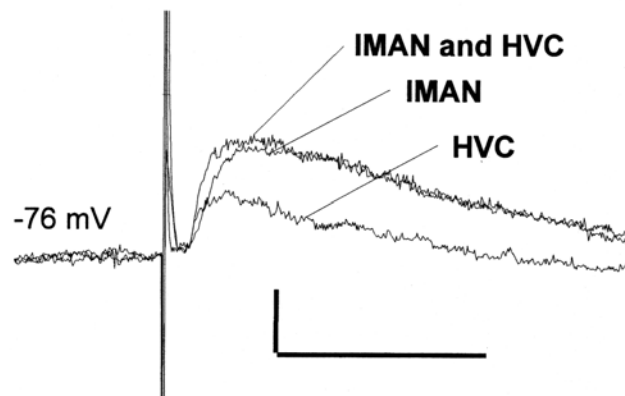


Abb.: 19: Intrazelluläre Ableitungen von einem ventral gelegenen RA-Neuron während Stimulationen des HVC-RA Fasertrakts oder des LMAN-RA-Fasertrakts (untere Kurvenverläufe) oder bei gleichzeitiger Stimulation beider Fasersysteme (oberer Kurvenverlauf) am *in vitro* Hirnschnittpräparat adulter Männchen. Die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale unterscheiden sich in ihrer Anstiegsflanke, sowie in ihrer Amplitude entsprechend dem aktivierten LMAN-, bzw. HVC-Eingangsfasern zum RA.

(aus: Nixdorf-Bergweiler, Sandakov und Heinemann, in Vorbereitung)

Die meisten der Projektionsneurone der ventromedialen Region unterscheiden sich von anderen in der Literatur beschriebenen RA-Projektionsneuronen (Spiro et al., 1999) insofern, daß sie rhythmisch aktiv sind und konstant Aktionspotentiale mit einer hohen Spikefrequenz abfeuern. Die Amplitude der Aktionspotentiale (AP) der rhythmisch aktiven Neurone betrug im Mittel 54.5 ± 4.5 mV, die Dauer (gemessen am Schwellenwert) 0.70 ± 0.07 mit einer Anstiegsflanke von 0.33 ± 0.03 msec und die dem AP folgende starke Nachhyperpolarisierung (AHP) lag bei 19.1 ± 3.2 mV. Depolarisierende Ströme erhöhten die Spikefrequenz (400pA DC bewirkte APs mit 99 Spikes per sec). Alle Neurone antworteten entweder ausschließlich auf HVC-RA-Fasertrakt Stimulation (33 %) oder auf HVC- und LMAN-RA-Fasertrakt Stimulation (67 %) (Sandakov und Nixdorf-Bergweiler, 1998). Abbildung 20 zeigt eine antidrome Antwortreaktion bei HVC-Fasertraktstimulation, sowie bei LMAN-Fasertraktstimulation. Nach dem bisherigen Wissensstand über das Verschaltungsschema im Gesangssystem dürften aber keine antidromen Spikes bei HVC-, bzw. LMAN-Faserstimulation meßbar sein. Somit könnten unsere Befunde sehr wahrscheinlich, ähnlich

wie die Befunde am LMAN, ein Hinweis für weitere Projektionen sein. Entsprechend antidromer und orthodromer Antworten können RA-Neurone der ventromedialen Region in 4

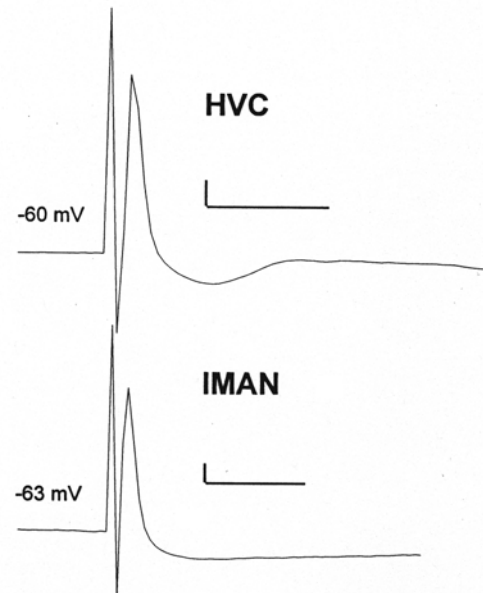


Abb. 20: Antidrom evozierte Aktionspotentiale in ventral gelegenen RA-Neuronen adulter Zebrafinkenmännchen am in vitro Hirnschnittpräparat. (A) Eine Reizstärke von 4 V auf das HVC-RA Fasersystem dorsal vom RA ruft ein antidromes Aktionspotential im RA-Neuron hervor. (B) Bei Überschreitung des Schwellenpotentials durch LMAN-RA Faserstimulation von 2 V feuert dieses ventral gelegene RA-Neuron mit einem antidrom evozierten Aktionspotential.

(aus: Nixdorf-Bergweiler, Sandakov und Heinemann, in Vorbereitung)

Gruppen eingeteilt werden: Neurone der ersten Gruppe erhalten nur Information vom HVC (11 von 15: 73 %) oder vom LMAN (6 von 13: 47 %), Neurone der zweiten Klasse projizieren ausschließlich zu einem der beiden Kerne (zum HVC: 7 %; zum LMAN: 31 %), Neurone der dritten Gruppe bilden einen Schaltkreis mit einem Nukleus, d.h. sie erhalten/sendern Information von/zum Nukleus (RA-HVC-RA: 20 %; RA-LMAN-RA: 15 %), die vierte Gruppe betrifft Neurone, die weder mit HVC noch mit LMAN verbunden sind (n=1). Neueren Befunden zufolge müssen aber auch noch andere Kernregionen als der HVC und der LMAN in dieses Verschaltungsmuster einbezogen werden (Vates et al., 1997; Foster et al., 1997). Die vorliegende Studie erweitert damit das komplexe Verschaltungsbild von RA-Neuronen (Nixdorf-Bergweiler, Sandakov und Heinemann, in Vorbereitung).

Kapitel 3

EINFLUSS DER GESANGSDEPRIVATION BEI ZEBRAFINKEN: VERHALTENS- BIOLOGISCHE UND NEUROANATOMISCHE UNTERSUCHUNGEN.

Aufgrund der bisher zu postulierenden Mechanismen für Gedächtnis und Lernen bei Säugern ist anzunehmen, daß auch beim Vogel Gedächtnisbildungsprozesse, die für das Gesangslernen notwendig sind, in verschiedenen Gehirnregionen stattfinden (Doya und Sejnowski, 2000). Aus verhaltensbiologischer Sicht findet diese Gedächtnisbildung in früher Jugend statt (Böhner, 1990; Eales 1985). Der anterioren Vorderhinschleife kommt bei diesen Prozessen eine besondere Bedeutung zu (Bottjer et al., 1989; Scharff und Nottebohm, 1991; Scharff et al., 1998; Doupe, 1997; Solis und Doupe 1999). Zebrafinkenmännchen ohne ein akustisches Vorbild (gesangsdeprivierte Tiere) hören keinen Zebrafinkengesang in früher Jugend, so daß in der Akquisitionsphase auch dementsprechend kein adäquates Gesangsmuster in der anterioren Vorderhirnschleife kodiert werden kann. In einem Vergleich zwischen sozial aufgezogenen und gesangsdeprivierten Tieren lassen sich die Effekte eines adäquaten Reizmusters auf verhaltensbiologischer, sowie auf neuronaler Ebene quantifizieren. Um einen Einblick in die Beziehung zwischen genetisch fixierten und erfahrungsabhängigen Faktoren für das Gesangslernen zu bekommen und deren Einfluß auf das neuronale Netzwerk und deren Verschaltung, werden Zebrafinken von Schlupf an ohne ein Gesangsmodell aufgezogen. In diesem experimentellen Ansatz werden junge Zebrafinken ausschließlich von Weibchen aufgezogen. Diese gesangsdeprivierten Zebrafinken können somit kein adäquates Gesangsmodell im Gedächtnis abspeichern, das sie zu einem etwas späteren Zeitpunkt in der Gesangsentwicklung für das motorische Gesangslernen, also dem Einüben des Gesangsmusters, entsprechend abrufen würden. Gesangsdeprivierte Zebrafinken entwickeln unter diesen Bedingungen einen abnormalen Gesang, der sich in vielen Parametern von einem normalen Zebrafinkengesang unterscheidet (Price, 1979; Eales, 1985, 1987; Morrison und Nottebohm, 1993; Williams et al., 1993; Volman und Khanna, 1995; Jones et al., 1996). Dementsprechend sollten die im Gesangsverhalten auftretenden Unterschiede auch im neuronalen Netzwerk Korrelate haben, insbesondere sollten neuronale Unterschiede in der anterioren Vorderhirnschleife zu finden sein. Daher haben wir auf der verhaltensbiologischen Seite die Gesangsentwicklung gesangsdeprivierter Tiere anhand

bioakustischer Parameter verfolgt und im einzelnen aufgezeichnet. In einem cytomorphometrischen Ansatz wurde die neuronale Struktur im lateralen magnocellularen Nucleus des anterioren Neostriatum auf zellulärer und synaptischer Ebene untersucht, sowie auch der Einfluß der Gesangsdeprivation auf die neuronale Struktur der Gesangskerne HVC und RA - Kernregionen, die letztendlich im Informationsfluß auch beim Gesangserwerb eine wichtige Rolle spielen (Doupe et al., 2000).

3. 1. Störungen im Frequenz- und Zeitmuster des Gesangsrepertoires

Im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit (1998) hat Axel Bindrich bei mir bioakustische Parameter gesangsdeprivierter und sozialer adulter Zebrafinken anhand von Sonagrammen in ihrer Frequenz-Zeit-Struktur analysiert. Es ist bekannt, daß Zebrafinkengesang sich aus einzelnen Gesangselementen zusammen setzt, die in einem auskristallisierten Gesang immer in konstanter Reihenfolge erscheinen und als Motiv bezeichnet werden (s. 1. 3. 3). Die Länge eines Motivs ist artspezifisch und liegt bei Zebrafinken zwischen 700 und 800 msec (Sossinka und Böhner, 1980). Da die einzelnen Elemente durch ihre Frequenz-Zeitstruktur charakterisiert sind und sich in ihrem Auftreten innerhalb eines Motivs bei verschiedenen Individuen unterscheiden, besitzt jeder Zebrafink einen ihm eigenen individuellen Gesang (Immelmann, 1969; Slater et al., 1988). In Abbildung 21 ist zum Vergleich ein Sonagramm eines sozial aufgewachsenen Tieres und das eines gesangsdeprivierten Tieres dargestellt. In unseren Untersuchungen zeigte sich, daß das Gesangsmuster gesangsdeprivierter Zebrafinken sich signifikant von normal aufgezogenen Tieren unterscheidet: gesangsdeprivierte Tiere weisen signifikant weniger Elemente auf (37 %), die Motivdauer ist doppelt so lang und die Periodendauer des Motivs fast dreimal so lang wie bei sozialen Tieren (Abb. 22). Bei der Klassifizierung der Gesangselemente hinsichtlich ihres Frequenz-Zeit-Musters konnten sie in Klick-, Noten- (komplexe Elemente) und Geräusch-Charakter eingeteilt werden. Die Elemente selbst hatten eher Klick- und Geräuschcharakter. In den von uns untersuchten gesangsdeprivierten Tieren waren die einzelnen Gesangselemente länger und enthielten oft mehr Klick-Laute als in sozialen Gesängen, ein Befund, wie er auch in anderen gesangsdeprivierten Tieren nachgewiesen wurde (Volman und Khanna, 1993; Williams et al., 1993; Jones et al., 1996). Interessanterweise findet man Einleitungselemente, wie sie für den Zebrafinkengesang typisch sind (Sossinka und Böhner, 1980), auch in gesangsdeprivierten Tieren, so daß sich hier die Frage stellt, ob Einleitungselemente genetisch fixiert sind. Unsere

quantitative Analyse zeigte, daß die Dauer und die Periodendauer eines Einleitungselementes in gesangsdeprivierten Tieren signifikant länger ist als in sozialen (79 ± 8 msec vs. 52 ± 7 msec). Daher ist anzunehmen, daß auch Einleitungselemente erlernt werden müssen, ihre Position zu Beginn einer Gesangsabfolge aber eine Prädisposition darstellt, da die von uns

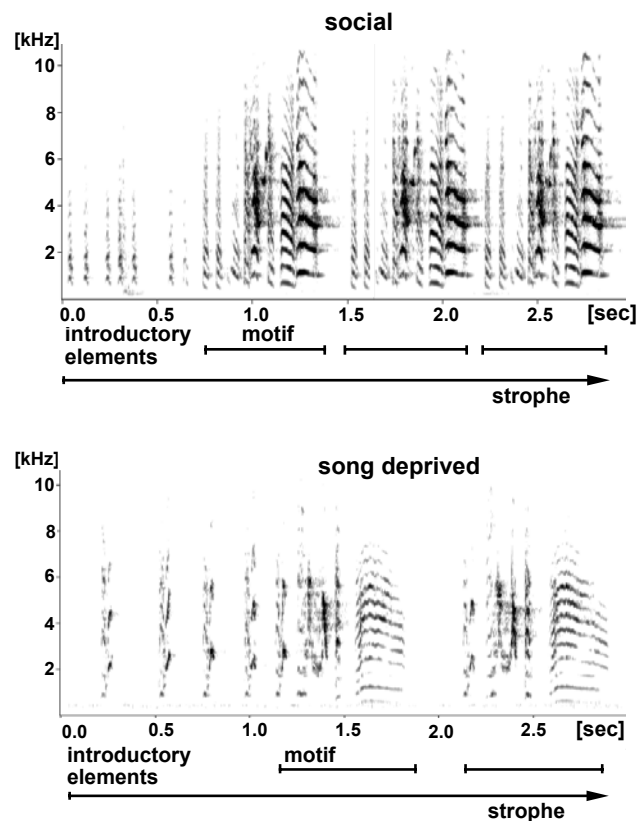


Abb. 21.: Sonagramm von Zebrafinken zur Darstellung der Effekte von Gesangsdeprivation auf die Gesangsstruktur. *Obere Abbildung:* auskristallisierte Gesangsstruktur eines sozial aufgewachsenen Zebrafinkenmännchens. *Untere Abbildung:* Gesangsdepriviertes Männchen mit stark veränderter Gesangsstruktur. Die Quantifizierung der einzelnen Parameter ist in Abbildung 22 dargestellt.

(aus: Nixdorf-Bergweiler, Bindrich und Frommolt, 1999)

untersuchten gesangsdeprivierten Zebrafinken alle ein Einleitungselement aufweisen (Nixdorf-Bergweiler, Bindrich und Frommolt, 1999). Für das Gesangssystem gibt es inzwischen zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Arten, die Zusammenhänge zwischen neuronaler Struktur und dem Gesangsverhalten in adulten Tieren aufzeigen, wenngleich einige dieser Ergebnisse auch widersprüchlich erscheinen (s. 2. 1). Es ist anzunehmen, daß auch die Verhaltensunterschiede in gesangsdeprivierten Tieren sich letztendlich in strukturellen Unterschiede widerspiegeln sollte. Für einen solchen

Zusammenhang sei als Beispiel die Motivlänge genannt. Es ist bekannt, daß der HVC als Mustergenerator wirkt: kurze Stromreize im Millisekundenbereich im HVC während einer Gesangsdarbietung brechen den Gesang unmittelbar ab und das Tier beginnt seine Gesangssequenz wieder von vorne (Vu et al., 1994). Demnach sollte die Verschaltung im HVC bei gesangsdeprivierten Tieren entsprechend verändert sein und diese Veränderung sollte auch morphologisch meßbar sein.

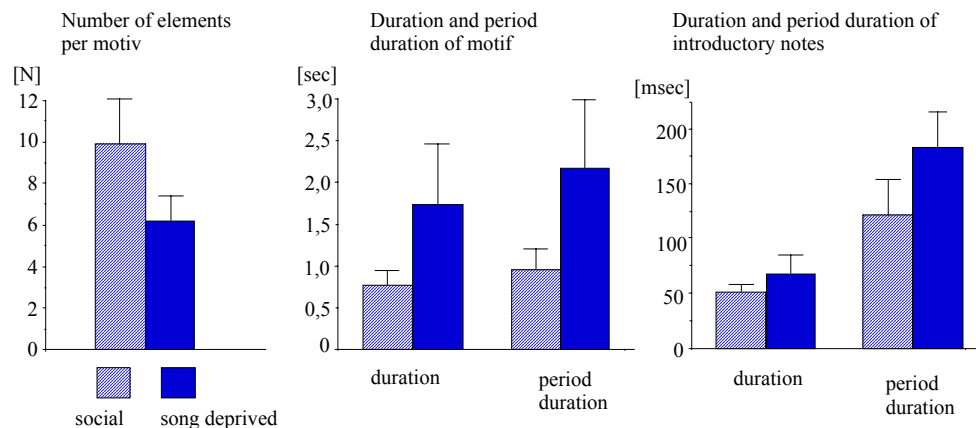


Abb. 22: Quantifizierung der Effekte von Gesangsdeprivation auf die Gesangsstruktur. Zebrafinchen, die ohne einen Tutor aufwachsen müssen, haben einen sehr variablen Gesang, dem vor allem die starre Anordnung der Elemente im Motiv fehlt. Dieser Gesang enthält auch weitaus weniger Elemente und die einzelnen Elemente sind nicht immer so stabil, wie es von sozial aufgewachsenen Tieren her bekannt ist.

(aus: Nixdorf-Bergweiler, Bindrich und Frommolt, 1999)

3. 2. Auswirkungen der Gesangsdeprivation auf das dendritische Verzweigungsmuster von Neuronen und synaptischen Kontakten im LMAN als erster Nachweis eines morphologisch identifizierten neuronalen Korrelats des Gesangslernens.

Der Aufbau neuronaler Schaltkreise wird ultimativ in der Ausbildung von synaptischen Verbindungen realisiert. Dabei stellt sich die Frage für das Gesangssystem, inwiefern und in welchem Ausmaß synaptische Plastizität während der Gesangsentwicklung auftritt. Dazu wurde im LMAN bei Männchen, wie bereits beschrieben (2.2) anhand von Golgi-Cox imprägnierten Neuronen die Entwicklung dendritischer Spines vor, während und nach dem Gesangslernen quantifiziert. Diese Ergebnisse zeigten, daß während der sensomotorischen Phase des Gesangslernens eine Reduktion synaptischer Kontakte (dendritischer Spines) stattfindet (Nixdorf-Bergweiler, Wallhäusser-Franke und DeVoogd, 1995). Dass dieser

Befund tatsächlich in einem kausalen Zusammenhang zum Gesangslernen steht, konnte in einem Versuchsansatz gezeigt werden, in dem Zebrafinkenmännchen ohne ein Gesangsmodell aufgewachsen sind. Das Auftreten dendritischer Spines an LMAN-Neuronen wurde sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen in vier verschiedener Gruppen untersucht: (A) gesangsdeprivierte Männchen, also Zebrafinken, die ohne erwachsenen Tutor aufgewachsen sind, wie auch (B) gesangsdeprivierte Weibchen, (C) sozial gehaltene

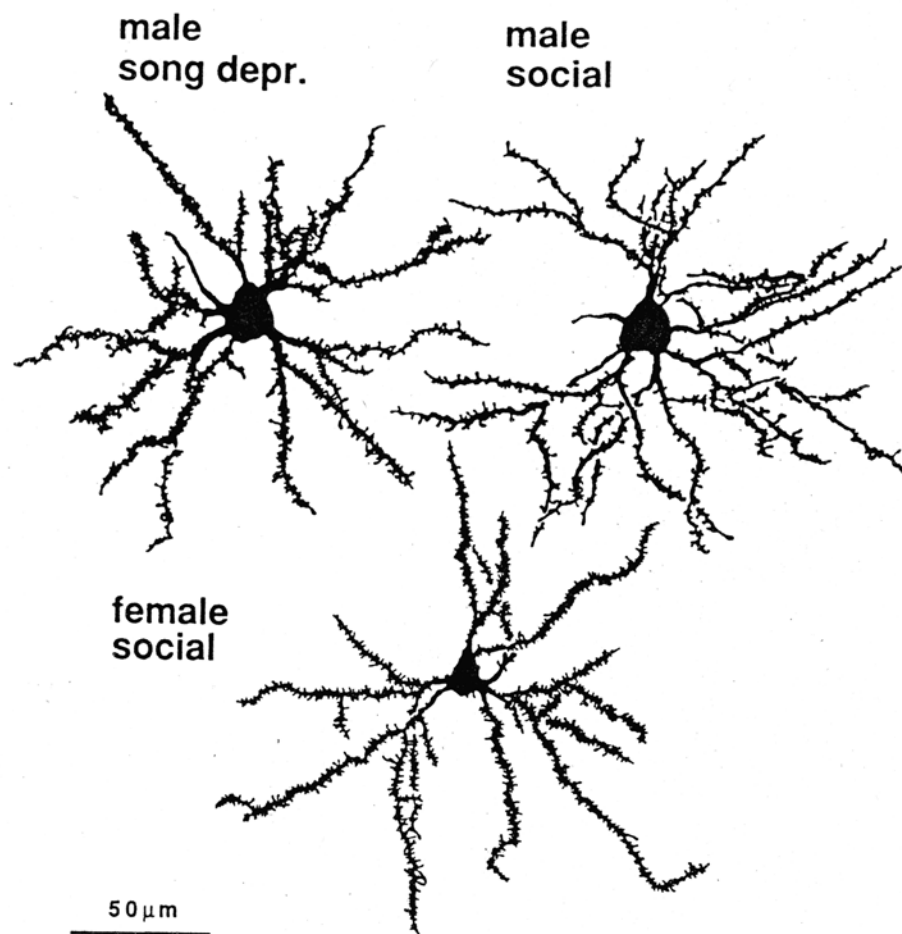


Abb. 23: Camera-Lucida-Zeichnungen von Neuronen im LMAN, die zahlreiche Dornenfortsätze (Spines) aufweisen und den größten Teil der Neuronenpopulation im LMAN ausmachen (Golgi-Cox imprägnierte Neurone 55-Tage alter Zebrafinken). In gesangsdeprivierten Männchen (male song depr.) ist der Spinebesatz an Dendriten der LMAN Neurone weitaus höher als in Zebrafinkenmännchen, die gemeinsam mit einem Tutor aufgewachsen sind (male social). Soziale Tiere haben größere Spineköpfchen und kürzere Spinehälse als gesangsdeprivierte Männchen. Das untere Neuron zeigt den hohen Spinebesatz bei sozialen, gesangserfahrenen Weibchen (female social). Die Neurone der Weibchen haben kleinere Zellkörper und weniger, sowie dünnere Dendriten als die Neurone der Männchen. (aus: Wallhäusser-Franke, Nixdorf-Bergweiler und DeVoogd, 1995)

Männchen mit einem Gesangsvorbild und (D) sozial gehaltene Weibchen. Das Alter der Tiere betrug 55 Tage und repräsentiert somit für die Gruppe der sozialen Tiere eine Altersgruppe, in der die Gedächtnisbildungsphase für eine Musterniederlegung einer Gesangsstruktur, die von einem Tutor erworben wird, abgeschlossen sein sollte (Übersicht in Nottebohm, 1993; Nordeen und Nordeen, 1997). Andererseits sollten die deprivierten Tiere noch in der Lage sein, einen Gesang zu erwerben (Eales, 1987). Verschiedene neuronale Parameter wurden im LMAN quantifiziert. In der Gesamtlänge der Dendriten (Summe aller Dendritensegmente eines Neurons) konnte zwischen den vier Gruppen kein Unterschied festgestellt werden.

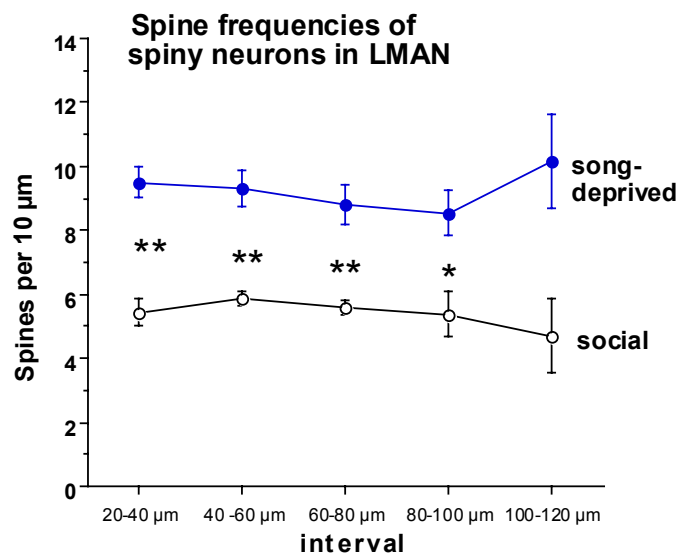


Abb. 24: Anzahl dendritischer Spines entlang eines Dendriten von LMAN-Neuronen in Zebrafinchmännchen, die mit einem Tutor, also einem Gesangsmodell aufgewachsen sind (social). Im Vergleich dazu ist die Anzahl dendritischer Spines von Zebrafinch aufgetragen, die kein Gesangsmodell in ihrer Entwicklung hören konnten (song deprived, gesangsdepriviert). Gesangsdeprivierte Tiere weisen einen höheren Spinebesatz pro 10 µm Dendritensegment entlang des gesamten Dendriten auf als soziale Tiere.

(verändert nach: Wallhäusser-Franke, Nixdorf-Bergweiler und DeVogd, 1995)

Jedoch gab es einen signifikanten Unterschied in dem Auftreten von dendritischen Spines zwischen sozialen und gesangsdeprivierten Männchen: Sozial gehaltene Männchen hatten 41 % weniger Spines pro Dendritensegment als gesangsdeprivierte Tiere, deren hohe Spinefrequenz der von sozial und gesangsdeprivierten Weibchen entsprach (Abb. 23, 24). Die Befunde der niedrigen Spinefrequenz lassen sich gut mit der Synapsenselektionshypothese erklären (Changeux und Danchin, 1976). Da in sozialen Tieren während der Gesangsentwicklung die Anzahl der dendritischen Spines entlang eines Dendriten abnimmt

(Nixdorf-Bergweiler, Wallhäusser-Franke und DeVoogd, 1995), kann geschlossen werden, daß eine Veränderung der Feinstruktur der axonalen Verbindungen zum LMAN nur dann eintritt, wenn in das neurale System während der Entwicklung entsprechende Information einfließt (i.e. stereotyper Zebrafinkengesang). Fehlt diese Information, so kommt es nicht zur „Ausdifferenzierung“ der axonalen Verbindungen. Entsprechende Synapsen können nicht abgebaut und andere gefestigt werden, so daß die erhöhte Spinefrequenz gesangsdeprivierter Tiere als Folge des fehlenden sensorischen Eingangs anzusehen ist. In einem anderen Tiermodell der akustischen Nachlaufprägung beim Haushuhnküken (*Gallus domesticus*) kommt es ebenso zu einer Spinereduktion während des Prägungsvorgangs und diese Spinereduktion findet im medialen Teil des rostralen Neostriatum/Hyperstriatum ventrale statt, dem MNH (Wallhäusser und Scheich, 1987; Scheich et al., 1991), sowie im dorsocaudal neostriatum, einem multimodalen Integrationsareal, das mit dem parietotemporalen Assoziationscortex bei Säugern verglichen werden kann (Bock und Braun, 1999). Auch bei der sexuellen Prägung bei Zebrafinken kommt es zu einer Abnahme dendritischer Spines in prägnungsrelevanten Arealen (Rollenhagen und Bischof, 1996, 1998). Somit kann die Synapsenselektionshypothese auch auf verschiedene Lernmodelle angewendet werden (Übersicht bei Bischof, 1997).

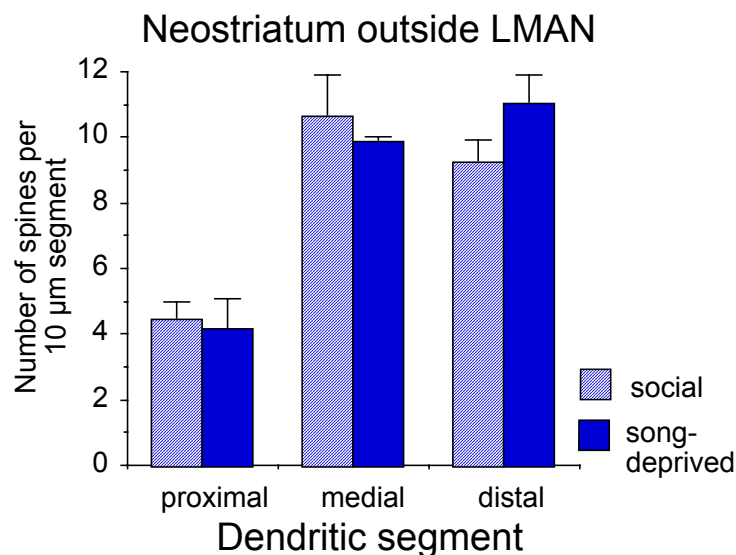


Abb. 25: Dendritische Spinefrequenz von Golgi-impregnierten Neuronen 55-Tage alter Zebrafinkenmännchen außerhalb der Kernregion LMAN im umliegenden Neostriatum. Die Quantifizierung der dendritischen Spinefrequenz im umliegenden Neostriatum weist keine Unterschiede in den Spinefrequenzen gesangsdeprivierter und sozialer Tiere auf: die Effekte der Gesangsdeprivation im Neostriatum sind spezifisch im LMAN lokalisiert. (aus: Kreck und Nixdorf-Bergweiler, unveröffentlicht)

Die Effekte der akustischen Deprivation sollten spezifisch nur in den an den Lernvorgängen beteiligten Regionen stattfinden. Um das zu überprüfen, wurde eine quantitative Analyse benachbarter Gehirnregionen im Neostriatum an den 55 Tage alten Zebrafinken der Golgi-Studie durchgeführt (G. Kreck und B.E. Nixdorf-Bergweiler, unveröffentlicht). Die Anzahl der Spines wurde mit der Neurolucida entlang des gesamten Dendriten ausgezählt und auf jeweils 20 µm Abschnitte eines Dendriten bestimmt. Unsere Datenanalyse an 70 Dendriten an 41 Neurone bei jeweils 3 sozialen und 3 gesangsisolierten Tieren, zeigte, daß es im Neostriatum außerhalb des LMANs keinen Unterschied in der Spinefrequenz zwischen sozialen und gesangsisolierten Tieren (8.2 ± 3.2 Spines vs 8.4 ± 3.7 Spines pro 10 µm Dendritensegment) gibt (Abb. 25).

3. 3. Effekte der Gesangsdeprivation auf die neuronale Organisation der anterioren Vorderhirnschleife: Weitere morphologische Belege für neuronale Korrelate des Gesangslernens

Ein erster Beitrag zu einem neuronalen Korrelat von Lernprozessen während der Akquisitionsphase wurde für den Nukleus lateralis magnocellularis des anterioren Neostriatum (LMAN) auf morphologischer Ebene nachgewiesen (Nixdorf-Bergweiler, Wallhäusser-Franke und DeVoogd, 1995; Wallhäußer-Franke, Nixdorf-Bergweiler und DeVoogd, 1995). Es stellt sich somit die Frage, welche weitere Kernregion des Gesangssystems an der Gedächtnisbildung beteiligt sind. Da der LMAN ein Kern der anterioren Vorderhirnschleife ist, lag die Vermutung nahe, daß auch die anderen Gehirnstrukturen dieser Bahn, insbesondere die Area X und der DLM, an Lernprozesse beteiligt sind (Doya und Sejnowski, 2000). Dies galt anhand der Untersuchung morphologischer Parameter zu überprüfen.

Der Befund, daß bei gesangsdeprivierten Zebrafinkenmännchen die Häufigkeit dendritischer Spines im LMAN während der Gesangsentwicklung nicht abnimmt wie in sozial aufwachsenden Tieren, weist auf einen kausalen Zusammenhang zwischen adäquaten Reizmuster und Gedächtnisbildungsphase (Akquisitionsphase) hin. Während der Akquisitionsphase wird das Gesangsmuster eines Tutors in zentrale Schaltkreise oder auch in Mikroschaltungen innerhalb einer Kernregion wie z.B. dem LMAN abgelegt und diese

eingehende Information sollte sich letztendlich in morphologisch erkennbare Veränderungen der Synapsenstruktur manifestierten. Die Gedächtnisbildungsprozesse finden sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen statt, denn auch Weibchen erlernen in früher Jugend nicht nur den Gesang ihrer Art zu erkennen, sondern können spätestens bei der Geschlechtsreife auch verschiedene Zebrafinkengesänge voneinander unterscheiden (Miller, 1979). In der Literatur gibt es Hinweise, daß bei Weibchen der LMAN bei dieser Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle spielt (Cleal et al., 1996; DeVoogd et al., 1996). Unsere Untersuchungen zur dendritischen Spinefrequenz zeigen allerdings, daß die Anzahl der Spines pro Dendrit in 55-tägigen sozial aufgezogenen Weibchen (mit Tutor) sich nicht von der Spinefrequenz gesangsdeprivierter Weibchen unterscheidet (Wallhäußer-Franke, Nixdorf-Bergweiler und DeVoogd, 1995). Daher bleibt zu untersuchen, ob die auch bei Weibchen zu erwartenden morphologischen Unterschiede zwischen sozial aufgezogenen und gesangsdeprivierten Tieren sich in anderen neuronalen Parametern widerspiegeln oder andere Kernregionen involvieren.

Sowohl für Männchen wie auch für Weibchen konnte Viola Hintz im Rahmen ihrer im Abschluß befindlichen Doktorarbeit zeigen, daß Gesangsdeprivation einen Einfluß auf die Größe von Gesangskernen hat, die Effekte aber geschlechtsspezifisch sind. In gesangsdeprivierten Männchen ist der HVC 22 % kleiner, der DLM dagegen um 32 % größer als in sozialen Tieren (Abb. 26) (Nixdorf-Bergweiler, Bindrich, Freyer und Hintz., 1999). Ein Vergleich des kleineren HVC-Volumens mit Volumina juveniler Stadien zeigt, daß das HVC-Volumen gesangsisolierter Tiere dem Entwicklungsstand von 30-tägigen sozial aufgewachsener Zebrafinken entspricht (Nixdorf-Bergweiler, 1996). Demnach hat der HVC sein adultes Volumen nicht erreicht, sondern ist auf einem frühen Entwicklungsstand stehengeblieben. Für das DLM-Volumen haben Johnson und Bottjer (1992) gezeigt, daß das Volumen des DLM zwischen 20 und 35 Lebenstagen um 30 % kleiner wird und seinen Adultwert erreicht. Daher könnte das größere DLM-Volumen gesangsdeprivierter Zebrafinkmännchen ebenso einen verzögerten Entwicklungsstand repräsentieren, da in diesen Tieren die Volumenabnahme nicht erfolgt. Mit den Schrumpfungsprozessen kommt es gleichzeitig zu einer Erhöhung der Neuronendichte, so daß die Gesamtneuronenanzahl im DLM sozialer Tieren unverändert bleibt (Johnson und Bottjer, 1992). In gesangsdeprivierten Tieren könnten somit Unterschiede in der Neuronendichte vorzufinden sein, was noch zu

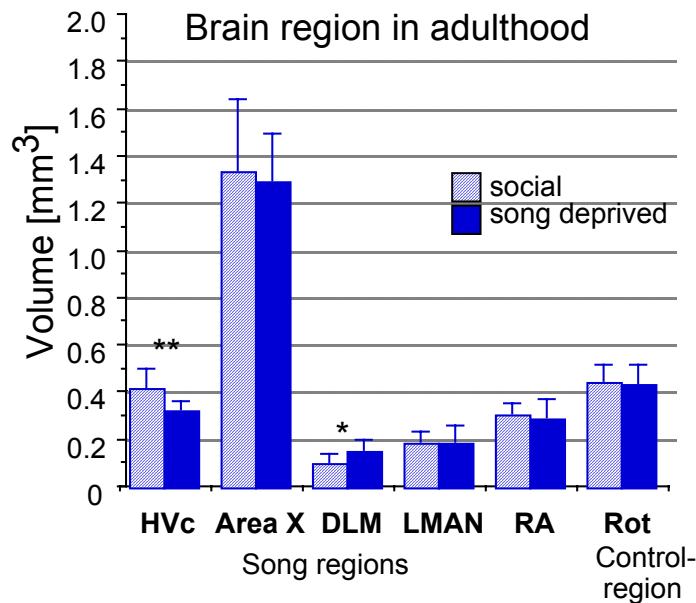


Abb. 26: Effekte von Gesangsdeprivation auf die Größe der Kernregionen HVc, area X, DLM, LMAN und RA der anterioren Vorderhirnschleife, sowie der Kontrollregion N. Rotundus (visuelles Projektionsareal) sozial aufgewachsener adulter männlicher Zebrafinken (sozial) und Zebrafinken, die ohne Gesangsvorbild aufgewachsen sind (depriviert). (aus: Nixdorf-Bergweiler, Bindrich, Freyer und Hintz, 1999)

untersuchen wäre. In dem prämotorischen Nucleus RA liegt die Neuronendichte in gesangsdeprivierten Männchen um 37 % höher als in sozialen. Da sich die RA-Volumen zwischen den untersuchten Gruppen nicht unterscheiden, ist somit die Gesamtanzahl der Neuronen in gesangsdeprivierten Tieren um 24 % höher (V. Hintz, persönliche Mitteilung). Im LMAN konnten weder im Volumen, noch in der Zellgröße, noch in der Zelldichte Unterschiede zwischen gesangsdeprivierten und sozial aufgezogenen Tieren entdeckt werden, auch gibt es keinen Unterschied im Vorkommen der CLA-Nucleoli, die in sozial aufgewachsenen Männchen ebenso zahlreich vorhanden sind wie in gesangsdeprivierten Tieren ($58.5 \pm 3.6\%$ vs. $65.8 \pm 3.8\%$) (Freyer und Nixdorf-Bergweiler, 1998). Damit ist von der morphologischen Seite her betrachtet, der Einfluß von Gesangsdeprivation im LMAN vor allem in den synaptischen Verbindungen zu finden (Wallhäußer-Franke, Nixdorf-Bergweiler und DeVoogd, 1995). Allerdings ist nicht bekannt, ob die dendritische Spinefrequenz auch noch in gesangsdeprivierten adulten Tieren erhöht vorliegt, wie es für 55-tägige gesangsdeprivierte Tiere gezeigt wurde. Es ist eher anzunehmen, daß in einem weitaus späteren Stadium die Spinefrequenz sich letztendlich reduziert, da in anderen Systemen mit ähnlichen neuronalen Mechanismen für Lernvorgängen die dendritische Spinefrequenz auf

einen niedrigeren Wert abfällt (Wallhäusser und Scheich, 1987; Scheich et al., 1991; Bischof, 1997; Bock und Braun, 1999). Insofern kommt den gemessenen Effekten der Gesangsdeprivation auf die Kernregionen der prämotorischen Bahn, HVC und RA, eine besondere Bedeutung zu, da sie auch noch im adulten Tier zu finden sind und sehr wahrscheinlich dauerhaft vorliegen.

Ein kleineres HVC-Volumen könnte sehr wahrscheinlich mit einer geringeren Gesangsaktivität verbunden sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß gesangsdeprivierte Tiere im allgemeinen nur sehr wenig singen (A. Bindrich, unveröffentlicht). Zum anderen beträgt das HVC-Volumen gesangsdeprivierter Männchen nur die Größe von 30-tägigen sozialen Tieren, bei denen das motorische Einüben von Gesangsstrukturen ganz am Anfang steht (Immelmann, 1969; Eales, 1985; Böhner, 1990). Auf den ersten Blick mag es überraschend sein, daß im HVC keine zellulären Effekte zu messen sind, obwohl sich das Volumen um 22 % verkleinert. Wenn es keine Unterschiede in der Zellgröße bzw. Zelldichte gibt, dann könnten Unterschiede in der Myelinisierung oder im Neuropil zu finden sein, die letztendlich für ein kleineres Volumen verantwortlich sind, was zu überprüfen wäre. Wie lassen sich die Effekte im RA erklären? Der RA erhält seine Information vom HVC, sowie auch vom LMAN. Da im LMAN keine signifikanten Unterschiede in der Zelldichte, wie auch in der Gesamtneuronenzahl gemessen worden sind, sollten die Verbindungen zum RA sich nicht von denen sozialer Tiere unterscheiden. Damit könnten die im RA gemessenen Effekte auf ein verändertes Innervationsmuster des HVC zurückzuführen sein. Warum sollte dieses Innervationsmuster verändert sein, wenn doch die Neuronenanzahl im HVC unverändert bleibt? Im HVC gibt es zwei Projektionsneuronenpools: HVC-Neurone, die in den RA projizieren und HVC-Neurone, die in die area X projizieren. Diese Neurone unterscheiden sich nicht nur morphologisch, sondern auch in ihren physiologischen Eigenschaften (Nixdorf, Davis und DeVoogd, 1989; Fortune and Margoliash, 1995; Benton et al., 1998; Dutar et al., 1998; Kubota und Taniguchi, 1998; Schmidt and Perkel, 1998). Ein weiterer großer Unterschied zwischen diesen Neuronenpools besteht in der Fähigkeit zur Neurogenese. Während HVC-area X Projektionsneurone fast ausschließlich embryonal gebildet werden, werden HVC-RA Projektionsneurone zeitlebens gebildet (Nordeen und Nordeen, 1988; Alvarez-Buylla et al., 1988, 1990, 1992; Gahr, 1990; Kirn et al., 1991, 1999; Kirn und Nottebohm, 1993; Alvarez-Buylla und Kirn, 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Neuronenpopulationen und ihrer unterschiedlichen Fähigkeit

zur Neurogenese, könnten insbesondere die HVC-RA Projektionsneurone von der Gesangsdeprivation betroffen sein, indem sie ihre Neurogeneserate verändern, was wiederum Einfluß auf das Innervationsmuster auf den RA hat. In vertäubten Zebrafinken wurde ein spezifischer Einfluß auf die Neurogenese der HVC-RA Projektionsneurone im HVC nachgewiesen (Wang et al., 1999). Vertäubung veränderte die dynamischen Prozesse von Zelltod und Neurogenese derart, daß die Neubildung von Zellen verlangsamt und die Überlebenszeit einzelner Neurone verlängert wird - die Gesamtanzahl der Neurone aber konstant bleibt (Burek et al., 1991). Da auch im HVC keine Veränderung in der Zellzahl bei Gesangsdeprivation zu erkennen ist, könnten Modifikationen in der Neurogeneserate die Veränderungen im RA hervorrufen. Es wird vermutet, daß der Einbau neugebildeter Nervenzellen in ein vorhandenes neuronales Netzwerk über zuvor stattfindenden Zelltod reguliert wird (Kirn et al., 1994). Untersuchungen der beiden Neuronenpopulationen im HVC (HVC-area X Projektionsneurone und HVC-RA Projektionsneurone), die selektiv aus dem Netzwerk ausgeschaltet wurden und eine anschließende Quantifizierung neugebildeter Zellen in den beiden Neuronenpopulationen weisen auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Zelltodrate und Neurogenese hin (Scharff et al., 2000).

Der RA ist charakterisiert durch Projektionsneurone und eine große Anzahl von Interneuronen. Er erreicht sein Adultvolumen indem sich seine Neurone während des Gesangslernens vergrößern und sich voneinander weiter entfernen (Konishi und Akutagawa, 1987; Kirn und DeVoogd, 1989). Inwiefern an diesen Prozessen auch Interneurone beteiligt sind ist noch unbekannt. Postnatale Neurogenese, wie sie fast überall im Telencephalon bei Vögeln auch noch im erwachsenen Tier zu finden ist, ist im RA so gut wie nicht vorhanden (Kirn und DeVoogd, 1989). Die beobachtete erhöhte Zelldichte in gesangsdeprivierten Zebrafinkenmännchen läßt sich somit durch erhöhte Neurogenese nicht erklären. Auch ist ein Einfluß der Gesangsdeprivation auf die Neurogenese in sehr frühen Entwicklungsstadien auszuschließen, indem z.B. Neurone in das neuronale Netzwerk im RA über einen weitaus längeren Zeitraum eingebaut werden könnten als normalerweise, da eine hohe Neurogeneserate bereits um den 6. Tag nach dem Schlupf endet (Kirn und DeVoogd, 1989). In sozialen Tieren nimmt die Zelldichte bei wachsendem RA-Volumen, größere werdenden Zellsomata und konstant bleibender Zellzahl notwendigerweise ab (Konishi und Akutagawa, 1985). In gesangsdeprivierten Tieren bleibt dieser Entwicklungsprozeß aus - die Zelldichte ist gegenüber sozialen Tieren weiterhin erhöht. Da die Zelltodrate im RA um den 30. Tag bei

sozialen Männchen rapide abnimmt, könnte aufgrund des veränderten Innervationsmusters vom HVC zum RA, die Neuronenpopulationen im RA unterschiedlich betroffen sein und die Zelltodrate beeinflussen, d.h. reduzieren. So könnte man sich vorstellen, daß in gesangsdeprivierten Tieren das Gleichgewicht von Projektionsneuronen und Interneuronen im RA gestört ist und so auf die akustischen Veränderungen in der Gesangsstruktur einwirken. Da die Interneurone im RA fast ausschließlich GABAerg sind (Spiro et al., 1999), könnte eine zu geringe bzw. nichtadäquate Innervation die in gesangsdeprivierten Tieren beobachtete veränderte Frequenzstruktur verursachen. Der kleinere HVC, der für die Generierung der Motive verantwortlich ist (Vu et al., 1994), könnte aufgrund seiner geringeren Größe an den extrem langandauernden Motiven in gesangsdeprivierten Tieren beteiligt sein. Somit könnten spezifische Effekte der Gesangsdeprivation unterschiedlichen morphologischen Strukturen zugeordnet werden, die wiederum sich gegenseitig beeinflussen.

Interessanterweise ist auch in gesangsdeprivierten Weibchen die Zelldichte im RA erhöht (42 %) (Hintz, Kreck und Nixdorf-Bergweiler, 1999). Auch hier gilt, daß eine Veränderung in der Neurogeneserate per se die erhöhte Zellzahl nicht erklären kann. Vielmehr läßt sich die erhöhte Zelldichte im RA zum Teil aufgrund der Volumenverkleinerung erklären, da gesangsdeprivierte Weibchen nur einen halb so großen

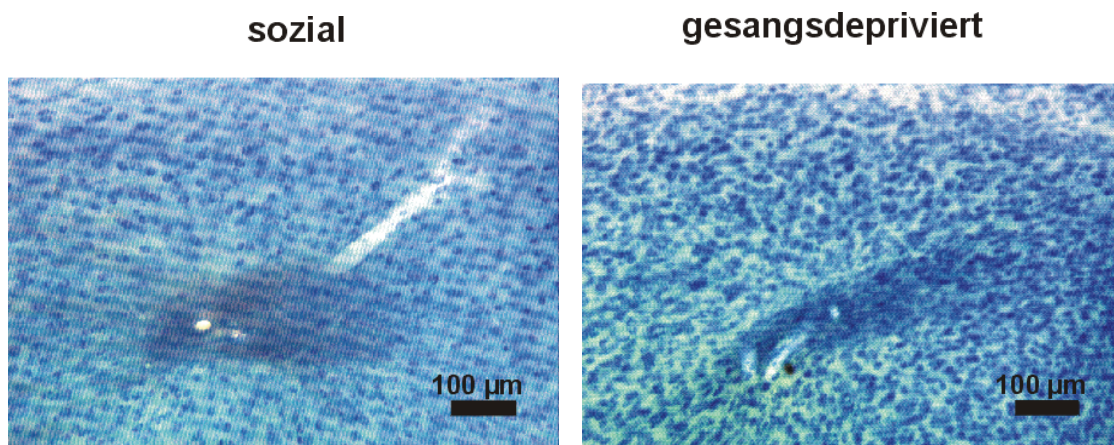


Abb. 27: Nissl-gefärbte Vibratomschnitte vom Nucleus robustus archistriatalis adulter weiblicher Zebrafinken (Sagittalschnitte, 100 µm dick). Weibchen, die ohne Zebrafinkengesang aufwachsen, weisen weitaus kleinere RA-Anschnittsflächen auf als soziale Tiere, die in ihrer gesamten Jugendentwicklung Zebrafinkengesang gehört haben.

RA aufweisen wie soziale. Dieser Volumenunterschied ist bereits in den Anschnittsflächen des RAs zu erkennen (Abb. 27). Auch sind die Zellsomata und Zellnuclei in gesangsdeprivierten Weibchen signifikant kleiner als in sozialen (Abb. 28). Damit haben soziale Zebrafinkenweibchen nicht nur einen größeren RA und größere Somata, sondern auch insgesamt 70 % mehr Neurone als gesangsdeprivierte Weibchen (Hintz, Kreck und Nixdorf-Bergweiler, 1999). In den Gesangkernen HVC und LMAN konnten keine Effekte der Gesangsdeprivation bei Weibchen gemessen werden. Die Befunde am RA sind insofern überraschend, da diese Kernregion bei Weibchen bisher nicht mit spezifischen Funktionen des Gesangssystems in Verbindung gebracht wurde, wohl aber der LMAN und der HVC wie Arbeiten auch an anderen Arten bestätigen (DeVoogd et al., 1996; Brenowitz et al., 1991; Hamilton et al., 1997; del Negro et al., 1998). Überraschend waren die Befunde im RA bei Weibchen auch insofern, da der RA als prämotorischer Kern bekannt ist, der bei Männchen

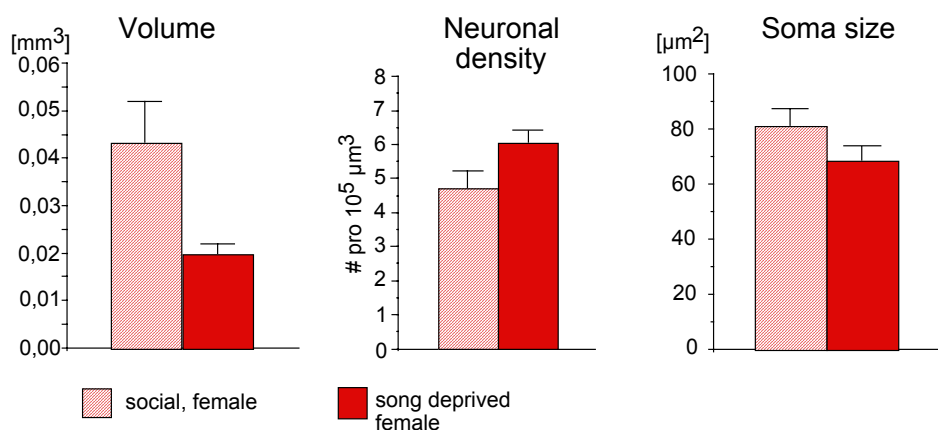


Abb. 28: Effekte der Gesangsdeprivation auf die neuronale Organisation des RA bei Weibchen. In gesangsdeprivierten Tieren ist der RA kleiner, die Zelldichte höher und die neuronalen Zellkörper sind kleiner als in sozial aufgewachsenen Tieren. (aus: Hintz, Kreck und Nixdorf-Bergweiler, 1999)

für die Produktion erworbener Gesangsstrukturen eine entscheidende Rolle spielt. Da im Gesangsverhalten ein besonders starker Sexualdimorphismus für Zebrafinken vorliegt - Zebrafinkenweibchen besitzen lediglich ein Rufrepertoire, sie singen nicht - wurden die kleineren Größen der Gesangsareale auf die fehlenden motorischen Fertigkeiten zurückgeführt. In den gesangsdeprivierten Weibchen liegen dagegen noch weitaus kleinere RA-Volumen vor, da die Neurone in RA in gesangsdeprivierten Weibchen weitaus mehr schrumpfen als in sozialen, so daß auch die Neuronendichte im RA in gesangsdeprivierten

Tieren sich stark erhöht. Daher ist der Nachweis der Effekte von Gesangsdeprivation im RA bei Weibchen von besonderem Interesse, ist es doch der erste Nachweis einer unmittelbaren Beteiligung dieses Gesangkerns im Zusammenhang mit spezifischen Lernprozessen bei Weibchen, der zeigt, daß der RA auch bei Weibchen in das neuronale Netzwerk für *Gesangslernen* (sensorisches Lernen) integriert ist.

Kapitel 4

UNTERSUCHUNGEN ZUR STEROIDSENSITIVITÄT UND ZUM SEXUALDIMORPHISMUS BEIM KANARIENVOGEL

In dem hier letzten Teil der Habilitationsschrift wird der Einfluß von Steroidhormonen auf die neuronale Struktur von Gesangsarealen im ultrastrukturellen Bereich beschrieben (DeVoogd, Nixdorf und Nottebohm, 1985; Clower, Nixdorf und DeVoogd, 1989), sowie eine Golgi-Studie vorgestellt, in der eine Klassifizierung von Neuronentypen im HVC durchgeführt wird (Nixdorf, Davis und DeVoogd, 1989). Wurde vor allem der Studie über die Steroidsensitivität auf Synapsenebene von Anfang an ein großes Interesse, auch außerhalb des Gesangssystems, entgegengebracht, so gewinnt die Untersuchung zu den Neuronentypen im HVC erst mit einem erweiterten Kenntnisstand der neuronalen Struktur des HVC an Bedeutung. Die morphologische Klassifizierung der HVC-Neurone erweist sich inzwischen als eine grundlegende Studie, die bei Tracerexperimenten sowie bei der Interpretation elektrophysiologisch markierter Zellen von vielen Autoren vergleichend herangezogen wird (e.g. Fortune and Margoliash, 1995; Benton et al., 1998; Dutar et al., 1998; Kubota und Taniguchi, 1998; Schmidt and Perkel, 1998).

4. 1. Welchen Einfluß hat Testosteron auf die Synaptogenese in Gesangskernen bei Weibchen?

Bei den Kanarienvögeln (*Serinus canarius*) singen vor allem die Männchen, Weibchen hingegen singen im allgemeinen nicht oder nur selten (Weichel et al., 1986; Nottebohm et al., 1990). Dieser Sexualdimorphismus auf der Verhaltensebene spiegelt sich auch in den neuronalen Strukturen wider, da bekanntermaßen die Gesangskerne der Männchen weitaus größer sind als die der Weibchen (Arnold und Nottebohm, 1976). Die Gesangskerne HVC und RA sind aber bei Männchen nicht immer gleich groß, sondern unterliegen bei Kanarienvögeln einem jahreszeitlichen Wechsel (Nottebohm, 1981). Im Frühjahr, wenn die Reproduktionsphase begonnen hat und das Gesangsrepertoire der Männchen besonders ausgeprägt ist, dann sind auch die Gesangskerne weitaus größer als im Herbst und Winter, wenn die Gesangsaktivität klein ist. Die Größe der für die Gesangskontrolle zuständigen Gehirnregionen scheint wiederum von Steroidhormonen abhängig zu sein (Nottebohm, 1980;

Nottebohm et al., 1986). Der Einfluß von Geschlechtshormonen auf das Gesangsverhalten wurde bereits von Leonard (1939; zitiert in Nottebohm, 1987) beschrieben: werden adulte weibliche Kanarienvögel mit Testosteron behandelt, so entwickelt sich ein männchen-ähnlicher Gesang. Parallel zu dieser Verhaltensänderung vergrößern sich auch die für den Gesang verantwortlichen Kernregionen (Nottebohm, 1980). Für den prämotorischen Nucleus RA konnte gezeigt werden, daß in testosteronbehandelten weiblichen Kanarienvögel die Dendriten eines bestimmten Neuronentyps ein Längenwachstum aufweisen (DeVoogd and Nottebohm, 1981a). Daher stellte sich die Frage, ob es mit dem Dendritenwachstum auch zu einer Neubildung von Synapsen entlang der Dendriten kommt. Dieser Frage sind wir in einer elektronenmikroskopischen Studie nachgegangen (DeVoogd, Nixdorf und Nottebohm, 1985).

Testosteron-implantierte adulte Kanarienvögelweibchen zeigten bereits nach einer Woche erste Männchen-ähnliche Gesangssequenzen, die nach 3 Wochen recht stabil waren. Gesangsentwicklung konnte allerdings nur in den Tieren beobachtet werden, die zum Frühjahr mit Testosteron implantiert wurden, bei Implantationen im Herbst konnten wir keinen Gesang beobachten. Daher wurden alle morphologischen Parameter nach Jahreszeiten getrennt analysiert, um mögliche Steroideffekte von saisonalen Einflüssen differenzieren zu können. Für die quantitative Analyse haben wir konventionelles Osmium-fixiertes Material gewählt, sowie auch Gewebe, das mit Wolframphosphorsäure behandelt wurde (EPTA-“Färbung“). EPTA markiert selektiv nur Synapsen, und zwar ausschließlich die synaptischen Kontaktzonen, sowie Zellkerne (Bloom und Agajanian, 1968). Das EPTA-Material wurde anhand von 0.2 µm Semidünnschnitten lichtmikroskopisch ausgewertet und diente dazu, einen allgemeinen Überblick über die Synapsendichte an verschiedenen Regionen innerhalb des RAs ohne die aufwendige Elektronenmikroskopie zu bekommen. Wir fest stellten, daß innerhalb des RAs die Synapsendichte nicht stark variiert und haben daher ausschließlich die zentrale Region des RAs elektronenmikroskopisch ausgewertet. Dabei konnten wir zeigen, daß mit dem hormoninduzierten Dendritenwachstum im RA die Ausbildung neuer Synapsen einhergeht und präsynaptische Terminalien der Axone sich vergrößern: Testosteron-behandelte adulte weibliche Kanarienvögel weisen 51 % mehr Synapsen auf als unbehandelte Tiere. Spätere Untersuchungen zeigten, daß der Zuwachs an Synapsen im RA entlang des gesamten Dendriten stattfindet und nicht nur an den Terminalsegmenten (Canady et al., 1988). Ferner erhöht sich in testosteronbehandelten Weibchen die Anzahl der synaptischen Vesikel im RA um 45 %. In der nachgeschalteten Station des RAs, dem Nucleus hypoglossus

trachaeosyringalis, dessen Motoneurone den Syrinx innervieren, kommt es ebenso zu Veränderungen in den synaptischen Strukturen. Auch hier kommt es unter Testosteroneinfluß während des Gesangslernens zu einer Erhöhung in der Anzahl der synaptischen Vesikel (Clower, Nixdorf und DeVoogd, 1989).

4. 2. Welche Neuronentypen gibt es im HVC und sind diese sexualdimorph?

Aufgrund seiner zentralen Lage in der prämotorischen Bahn und seiner Einbindung in die AFP wurde für den HVC bereits 1987 eine wichtige Funktion in der vokal-auditorischen Integration beim Gesangslernen gefordert (Okuhata und Saito, 1987). Wenngleich verschiedene Untersuchungen zur Struktur und Morphologie individueller Neurone (Katz und Gurney, 1981; Paton und Nottebohm, 1984; Paton et al., 1985) oder einer einzelnen Klasse von Neuronen vorliegen (Rausch und Scheich, 1982), so fehlte doch bisher eine detaillierte systematische morphologische Charakterisierung der Neuronenpopulation im HVC. Um diese Lücke zu schließen haben wir eine cytomorphologische Charakterisierung der neuronalen Struktur des HVC beim Kanarienvogel anhand von Golgi-imprägnierten Neuronen durchgeführt (Nixdorf, Davis und DeVoogd, 1989). Eine Klassifizierung der Neuronenpopulation wurde ebenso an Weibchen durchgeführt, um zu überprüfen, ob der auf der Verhaltensebene erkennbare Sexualdimorphismus, der sich in kleinere Kernregionen bei Weibchen widerspiegelt (Nottebohm und Arnold, 1976), auch auf der Ebene neuronaler Strukturen erkennbar ist.

Mit der Golgi-Technik lassen sich einzelne Neurone detailliert mit ihrem dendritischen Verzweigungsmuster, den dendritischen Spines, ihrem Zellkörper und ihrem Axon, einschließlich axonaler Verzweigungen darstellen. Von den beiden klassischen Golgi-Techniken, Golgi-Cox und Rapid-Golgi, haben wir für unsere Studie Rapid-Golgi gewählt. Zum einen verkürzt sich bei dieser Technik die Imprägnierungszeit um einige Wochen, zum anderen werden auch weniger Neurone aus der Gesamtpopulation „gefärbt“, so daß individuelle Neurone besser identifizierbar sind und sich leichter rekonstruieren lassen. Um mir einen Gesamteindruck der Neuronenpopulation im HVC zu verschaffen, habe ich von vielen Neuronen Camera-Lucida-Zeichnungen erstellt. Viele dieser Neurone wurden dann in einer 3-D-Rekonstruktion oft über mehrere Schnitte rekonstruiert und morphometrisch analysiert. Bei der Quantifizierung des neuronalen Verzweigungsmusters fanden wir für HVC-Neurone ein weitreichendes Dendritenfeld mit einem Durchmesser bis zu 350 µm. Bei

einer Schnittdicke von 120 μm bedeutet das, daß fast alle Neurone mit ihren Dendritenbäumen für diese Studie rekonstruiert werden mußten.

Im HVC gibt es drei große Klassen von Neuronen mit zahlreichen Spines

Unseren Beobachtungen zufolge lassen sich HVC-Neurone in insgesamt drei große Klassen einteilen, die sich vor allem in ihrer Spinedichte, aber auch in der Größe und Form ihres Dendritenfeldes, sowie in der Zellkörpergröße unterscheiden (Abb. 29-30) (Nixdorf, Davis und DeVoogd, 1989). Neurone mit extrem wenigen Spines, die dementsprechend eine weitere, vierte Klasse, bilden, wurden auch beobachtet, aber nicht quantifiziert, da bei diesem Neuronentyp das axonale Verzweigungsmuster mit dem Dendritenbaum verflochten war und somit die Dendriten nicht eindeutig und zuverlässig in ihrer Gesamtlänge identifiziert werden konnten. Alle drei Neuronenklassen spinereicher Neurone haben wir sowohl in Männchen wie auch in Weibchen vorgefunden. Neurone mit langen, dicken Dendriten, die mit zahlreichen Spines (1.8 Spines auf 1 μm -Dendritensegmentlänge) besetzt sind, haben wir FD ("furry dendrites") Neurone genannt (Abb. 29a; 30a). Neurone mit ebenso langen, dicken Dendriten, aber einer geringeren Spinedichte (0.8 Spines pro μm) nannten wir TD ("thick dendrites") Neurone (Abb. 29c,d; 30c, d). Neurone mit kurzen, dünnen Dendriten und wenigen Spines (0.4 Spines pro μm) klassifizierten wir als SD Neurone ("short dendrites") (Abb. 29b; 30b). In der Abbildung 31 sind einzelne Dendritensegmente mit ihrem Spinebesatz vergrößert dargestellt, um die unterschiedlichen Spinedichten der drei Hauptklassen FD, TD und SD aufzuzeigen. TD Neurone lassen sich aufgrund der Form ihres Dendritenfeldes in zwei weitere Teilpopulationen unterteilen: TD1 Neurone weisen ein kreisrund angeordnetes Dendritenfeld auf, TD2 Neurone hingegen ein eher elliptisch angeordnetes Feld, das signifikant größer ist als das der TD1 Neurone. Auch in der Anzahl der Dendritensegmente fanden wir Unterschiede in den beiden Teilpopulationen, sowie in ihren Spinedichten auf ganz bestimmten Dendritensegmenten (i.e. 40 bis 80 μm vom Zellkörper entfernt). Die Größe der Somata unterscheidet sich in den beiden Teilpopulationen aber nicht. TD-Neurone haben insgesamt die größten Zellkörper (150 μm^2 Anschnittsfläche) und unterscheiden sich signifikant von SD-Neuronen, die mit ca. 100 μm^2 recht kleine Soma aufweisen. TD-Neurone weisen intermediäre Somagrößen (129 μm^2) auf. Bei einem Geschlechtervergleich stellten wir fest, daß sich bis auf eine Teilpopulation (TD2) die Neurone im HVC bei Männchen und Weibchen voneinander nicht unterscheiden. TD2

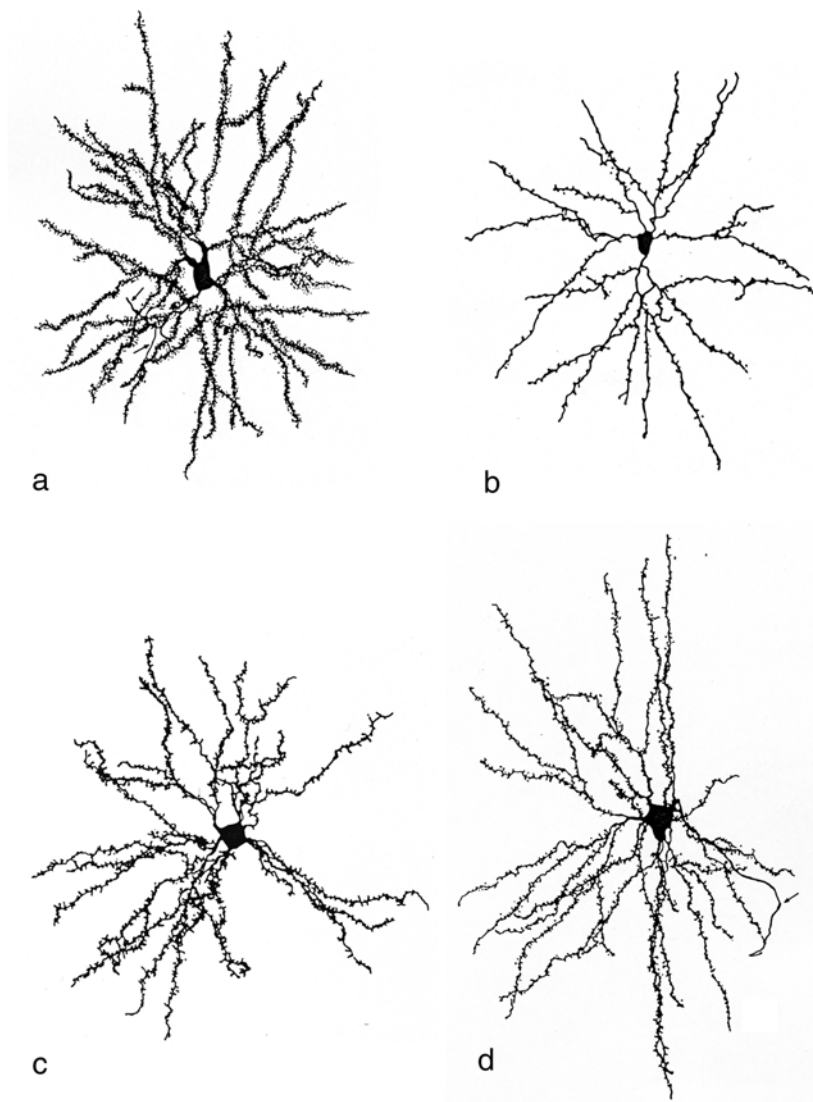


Abb. 29: Repräsentative Cameral-Lucida-Zeichnungen von Rapid-Golgi-impregnierten Neuronen im HVC des Kanarienvogels. Im HVC gibt es drei Klassen von Neuronen, die Spines an ihren Dendriten aufweisen: FD-, TD- und SD-Neuronen. Diese Neuronenklassen unterscheiden sich hinsichtlich verschiedener Parameter, vor allem aber in ihren Spinedichten. (a) FD-Neuron. Diese Neuronenklasse ist charakterisiert durch dicke Dendriten und einen sehr hohen Spinebesatz. Die beiden Pfeile markieren Axonkollaterale. (b) SD-Neuron. Diese Neurone sind durch sehr dünne Dendriten charakterisiert ($1,2\ \mu\text{m}$ im Durchmesser) und einer sehr niedrigen Spinedichte. (c, d) TD-Neurone. Diese Klasse hat im Vergleich zu den anderen beiden Klassen ein größeres variables Erscheinungsbild. Aufgrund der Anordnung seines Dendritenbaumes haben wir zwei Untergruppen gebildet: (c) radiär angeordnete Dendriten bilden die TD1-Neurone, (d) mehr ellipsoid angeordnete Dendritenbäume bilden die TD2-Neurone. Von allen untersuchten Neuronen im Rapid-Golgi-Präparat konnten nur Neurone der TD2-Teilpopulation als sexualdimorph nachgewiesen werden. Maßstab: $25\ \mu\text{m}$.
(modifiziert nach: Nixdorf, Davis und DeVoogd, 1989)

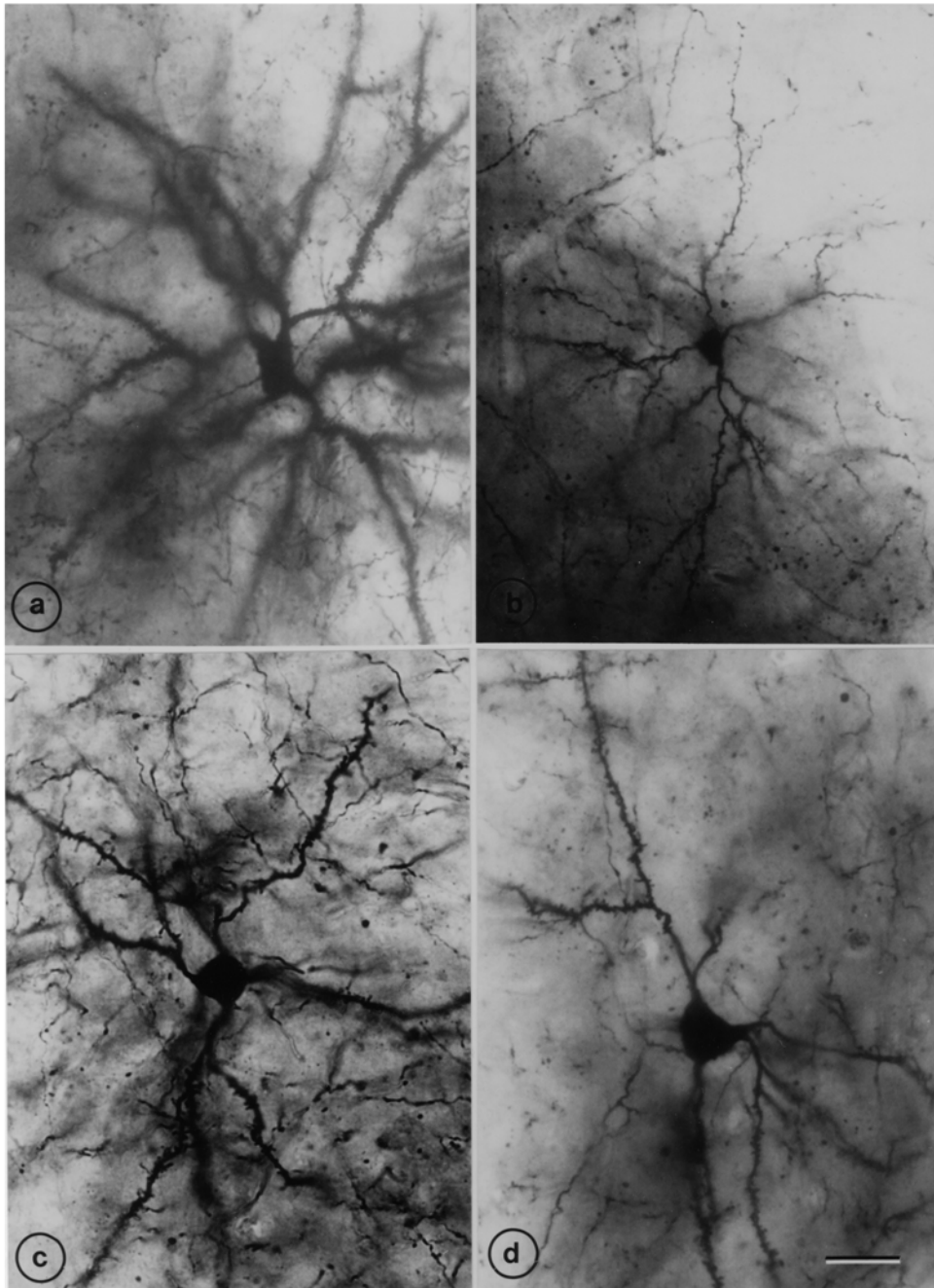


Abb. 30: Lichtmikroskopische Abbildungen Rapid-Golgi-impregnierter Neurone, welche die drei großen Neuronenklassen im HVC des Kanraienvogels repräsentieren. (a) FD-Neuron, charakterisiert durch eine hohe Spinedichte und weit verzweigtem Dendritenbaum. Die zugehörige Camera-Lucida-Zeichnung ist in Abb. 29a wiedergegeben. (b) SD-Neuron, charakterisiert durch dünne, kurze Dendriten und einer niedrigen Spinedichte. Die zugehörige Camera-Lucida-Zeichnung ist in Abb. 29b dargestellt. (c) TD1-Neuron mit typisch radiär angeordneten Dendriten; die zugehörige Camera-Lucida-Zeichnung findet sich in Abb. 29c. (d) TD2-Neuron mit einem asymmetrischen Dendritenfeld. Diese Teilpopulation der TD-Neuronenklasse ist sexualdimorph.

(modifiziert nach: Nixdorf, Davis und DeVoogd, 1989)

Neurone hingegen sind sexualdimorph, wobei die Männchen weitaus größere Dendritenfelder und andere Verzweigungsmuster aufweisen als Weibchen.

Zuordnung physiologischer Eigenschaften auf die unterschiedlichen Neuronentypen

Unsere detaillierte cytomorphologische Charakterisierung zeigt, daß sich im HVC die Neurone aufgrund ihrer morphologischen Struktur eindeutig voneinander unterscheiden und prinzipiell vier mehr oder weniger variablen Klassen zugeordnet werden können. Daran schließt sich unmittelbar die Frage, ob sich mit dieser morphologischen Differenzierung auch Unterschiede in den funktionellen Eigenschaften der HVC-Neurone aufzeigen lassen. Die Ergebnisse verschiedener experimenteller Ansätze belegen, daß es in der Tat zahlreiche Unterscheidungsmerkmale der HVC-Neurone gibt, da sich die Neurone aufgrund ihrer Projektionsgebiete (Katz und Gurney, 1981; Fortune and Margoliash, 1995; Benton et al., 1998), sowie ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften (Dutar et al., 1998; Kubota und Taniguchi, 1998; Schmidt and Perkel, 1998), ihrem Gen-Expressionsmuster (Holzenberger et al., 1997; Kimpo und Doupe, 1997; Sakaguchi et al., 1999), wie auch in ihrer Fähigkeit zur Neurogenese voneinander unterscheiden (Alvarez-Buylla et al., 1990; Kirn und Nottebohm, 1993; Kirn et al., 1994; Kirn und Schwabl, 1997; Wang et al., 1999) und dass diese Unterschiede sich in den von uns identifizierten Neuronenklassen größtenteils widerspiegeln.

HVC-Projektionsneurone schicken ihre Axone entweder zur rostral gelegenen area X der anterioren Vorderhirnbahn (AFP) oder zum prämotorischen Nucleus RA, der im caudalen Telencephalon liegt. Diese beiden Typen von Projektionsneuronen sind im HVC nicht topographisch angeordnet, sondern über die gesamte Kernregion verteilt. Dennoch gibt es markante Unterschiede in diesen Neuronen: Neurone, die zur area X projizieren, zeigen so gut wie keine Neurogenese, HVC-RA-Projektionsneurone hingegen werden innerhalb eines Jahres fast vollständig erneuert (Alvarez-Buylla et al., 1990; Kirn et al., 1994). Retrograde Markierungsexperimente am Kanarienvogel, sowie auch am Zebrafinken zeigten, daß sich die Neurone hinsichtlich ihrer Zielgebiete auch morphologisch voneinander unterscheiden und in jeweils eine der von uns identifizierten Klassen eingeordnet werden können: area X-Projektionsneurone entsprechen aufgrund ihrer Form und dendritischen Spinedichte der Klasse der TD-Neurone, RA-Projektionsneurone hingegen lassen sich in die SD-

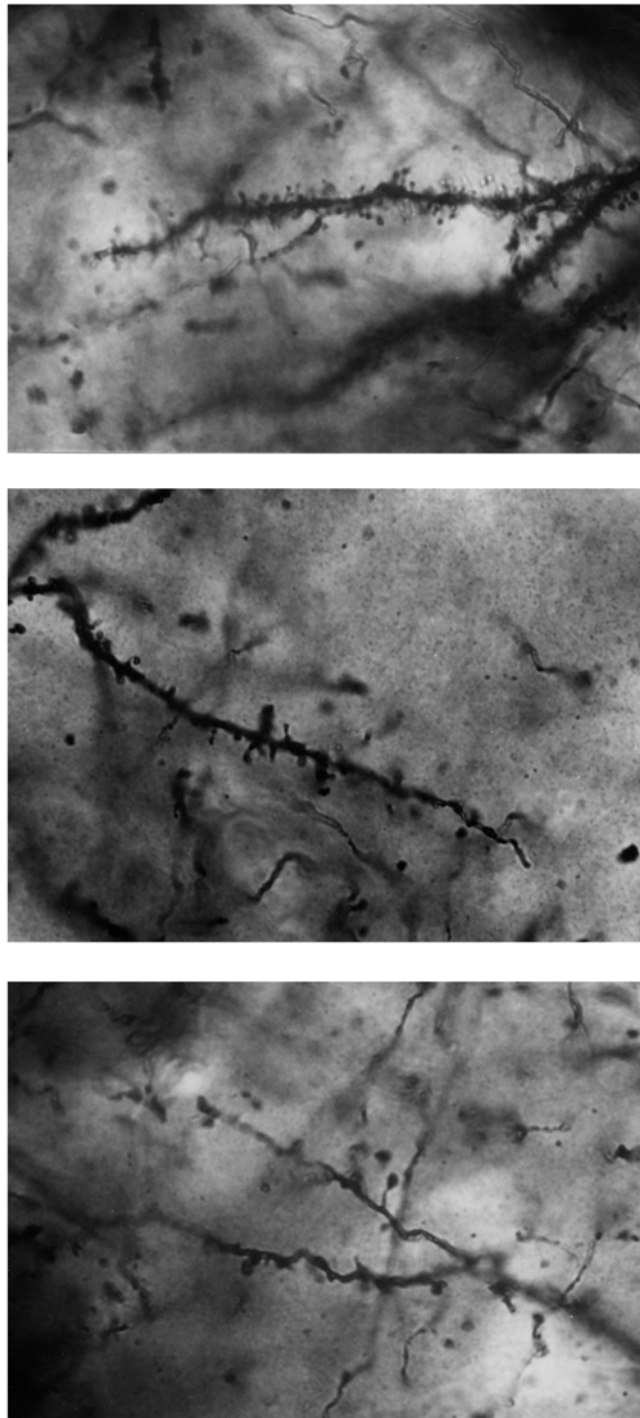


Abb. 31: Lichtmikroskopische Abbildung einzelner Dendriten von Rapid-Golgi-imprägnierten Neuronen im HVC, um den unterschiedlichen Spinebesatz der drei hauptsächlichen Neuronenklassen zu demonstrieren. *Obere Abbildung:* Dendriten von FD-Neuronen weisen eine hohe Spinedichte auf (1,8 Spines pro 1 μm Dendritensegment). *Mittlere Abbildung:* Dendriten von TD-Neuronen weisen eine mittlere Spinedichte auf (0,8 Spines pro 1 μm Dendritensegment). *Untere Abbildung:* Dendriten von SD-Neuronen haben mit 0,4 Spines pro 1 μm Dendritensegment die kleinste gemessene Spinedichte aller HVC-Neuronenklassen.

Neuronenklasse einordnen (Fortune und Margoliash, 1995; Benton et al., 1998). Anhand intrazellulärer Ableitungen am *in vitro* Hirnschnittpräparat und anschließender Farbstoffmarkierung können ebenso eindeutig morphologische Unterschiede mit spezifischen elektrophysiologischen Eigenschaften korreliert werden. Auch hier zeigte sich, daß unsere am Golgi-Material durchgeführte Klassifizierung recht gut mit den Befunden am Hirnschnittpräparat übereinstimmen, wenngleich die Nomenklatur variiert (Dutar et al., 1998; Kubota und Taniguchi, 1998). Typ I-Neurone, die unseren TD-Neuronen entsprechen und zur area X projizieren, unterscheiden sich von anderen Neuronentypen vor allem durch eine lang andauernde Nachhyperpolarisation. Dieser Neuronentyp antwortet vor allem dann mit Aktionspotentialen, wenn er rhythmische Eingangssignale ganz bestimmter Frequenzen erhält. Daher spielen diese Typ I-Neurone, welche unseren TD-Neurone entsprechen, sehr wahrscheinlich bei den rhythmischen Aktivitätsmustern im HVC eine wichtige Rolle. Typ IIa-Neurone, die unseren SD-Neuronen entsprechen und zum RA projizieren, müssen sehr stark depolarisiert werden, um eine entsprechende Antwortreaktion auszulösen. Eine solche starke Depolarisation entspricht einem Neuronentyp, der nur auf bestimmte Zeitmuster reagiert ('temporal combination-sensitive neurons') oder auf die Kombination ganz bestimmter harmonischer Frequenzbänder ('harmonic combination-sensitive neurons'), um Aktionspotentiale auszulösen. Der von uns identifizierte FD-Neuronentyp konnte ebenso elektrophysiologisch charakterisiert werden und entsprach dem Typ IIb-Neuronen. Diese Neuronen spielen sehr wahrscheinlich bei der Koordination der Feueraktivität anderer Neuronenklassen oder anderer Typ IIb-Neuronen eine wichtige Rolle (Kubota und Taniguchi, 1998). Ob es sich bei den TypIIb-Neuronen damit tatsächlich um Interneurone handelt ist nicht eindeutig geklärt. In der Arbeit von Dutar et al., (1998) werden am *in vitro* Hirnschnittpräparat area X-Projektionsneurone (=Typ I-Neurone) ebenso als TD-Neurone und RA-Projektionsneurone (=Typ II-Neurone) als SD-Neurone identifiziert. Diese beiden Neuronentypen unterscheiden sich eindeutig nicht nur in ihren morphologischen, sondern auch in ihren physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften: area X-Projektionsneurone (also unsere TD-Neurone) sind durch langandauernde Feuerraten, langsame inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) und einer ungewöhnlichen, hyperpolarisierenden Antwortreaktion auf metabotrope Glutamatrezeptor (mGluR)-Aktivierung charakterisiert. RA-Projektionsneurone (also unsere SD-Neurone) hingegen

akkomodieren stark, bilden keine langsamen IPSPs und werden auch nicht durch mGluR-Antagonisten hyperpolarisiert.

Elektrophysiologische Untersuchungen *in vivo* zeigen, daß Projektionsneurone zur area X größtenteils auditorisch sind und bevorzugt auf das eigene Gesangsmuster reagieren. Für die Projektionsneurone zum RA sind die Aussagen nicht eindeutig (Katz und Gurney, 1981; Lewicki, 1996; Lewicki und Konishi, 1995; Doupe und Konishi, 1991; Dutar et al., 1998). RA-Projektionsneurone lassen sich daher sehr wahrscheinlich weiter in zwei Subpopulationen unterteilen, in eine auditorische und eine nicht-auditorische (Dutar et al., 1998). Für den Kanarienvogel konnte aufgrund der hohen Variabilität innerhalb der SD-Klasse keine eindeutigen morphologischen Teilpopulationen nachgewiesen werden (Nixdorf, Davis und DeVoogd, 1989). Aufgrund elektrophysiologischer Daten erwarten auch Kubota und Taniguchi (1998), daß es zwei Klassen von RA-Projektionsneuronen geben sollte, die sie aber bisher nicht nachweisen konnten. Die von uns morphologisch charakterisierten Neuronenklassen des HVCs konnten somit anhand zahlreicher elektrophysiologischer Untersuchungen im Einklang mit der Klassenstruktur ganz spezifische funktionelle Eigenschaften zugeordnet werden. Diese verschiedenen Neuronentypen werden dementsprechend sehr wahrscheinlich spezifische Information zu ihren postsynaptischen Zielstrukturen bringen.

Nur eine Teilpopulation der HVC-Neuronenklassen ist sexualdimorph

Von den verschiedenen untersuchten Neuronentypen im HVC konnte nur eine (TD2 Subpopulation) als sexualdimorph von uns nachgewiesen werden (Abb. 29d; 30d). Die geringe Zahl sexualdimorpher Neuronenklassen im HVC bei Kanarienvögeln war zum Zeitpunkt der Studie überraschend, läßt sich aber durch neuere Befunde mittels Läsionsstudien erklären, da der HVC auch bei Weibchen eine wichtige Rolle bei der Gesangserkennung spielen soll (Brenowitz et al., 1991; Del Negro et al., 1998). Brenowitz et al. (1991) testete in Verhaltensstudien anhand von bilateralen Läsionen des HVCs die Reaktionsrate des ‘copulation solicitation displays (CSDs)’, ein spezifisches Verhalten, das bei sexuell stimulierendem Gesang vom Weibchen geäußert wird. Kontrolltiere mit intaktem HVC zeigten CSDs nur auf arteigenen Gesang, Kanarienvogelweibchen mit zerstörtem HVC hingegen waren nicht mehr in der Lage arteigenen Gesang von artfremden zu unterscheiden und reagierten auf beide Gesangstypen. Da die Läsionen auch Teile des angrenzenden caudal

gelegenen Neostriatum betrafen, war nicht eindeutig, ob der HVC selbst oder angrenzende Gehirnregionen die beobachteten Effekte hervorriefen. Del Negro et al., (1998) nahmen diesen Ansatz auf und testeten Kanarienvogelweibchen ebenso mittels CSDs vor und nach partieller chemischer Läsionen im HVC, indem ihnen nicht nur arteigener und artfremder Gesang dargeboten wurde, sondern auch innerhalb des arteigenen Gesangs zwischen sexuell wenig attraktiven Gesang und sexuell hochattraktiven Gesang unterschieden wurde. Von allen getesteten Gesängen zeigte der sexuell hochattraktive Gesang die höchste Reaktionsrate des CSDs. Auf schwach sexuell attraktiven arteigenen Gesang, sowie auf artfremden Gesang zeigten die Tiere so gut wie keine CSDs. Die Antwortreaktionen läsionierter HVC-Tiere unterschieden sich ebenso wie bei Brenowitz et al. (1991) immer von denen der Kontrolltiere. Die Lage der Läsion innerhalb des HVCs spielte dabei keine Rolle. Der HVC bei weiblichen Kanarienvögel ist demnach an der Gesangserkennung beteiligt und bei der Kontrolle sexueller Präferenzen im neuronalen Netzwerk integriert. Allerdings läßt sich diese Aussage nicht auf alle saisonale 'open-ended learners' übertragen, denn für den Langschnabel-Sumpfaunkönig konnte beispielsweise anhand von Läsionsstudien weder für den HVC, noch für den RA eine Beteiligung an der Gesangserkennung nachgewiesen werden (Brenowitz et al., 1994). Für diese Art sollten sich daher die Neuronentypen zwischen den Geschlechtern stark unterscheiden, was noch zu untersuchen wäre.

V. LITERATUR ZUM HABILITATIONSTHEMA

5. 1. Eigene Originalartikel

1. DeVoogd, T.J., B. Nixdorf, and F. Nottebohm (1985) Synaptogenesis and changes in synaptic morphology related to acquisition of a new behavior. *Brain Research* 329: 304-308.
2. Clower, R., B.E. Nixdorf, and T.J. DeVoogd (1989) Synaptic plasticity in the hypoglossal nucleus of female canaries: structural correlates of season, hemisphere and testosterone treatment. *Behavioral and Neural Biology* 52: 63-77.
3. Nixdorf, B.E., S.S. Davis, and T.J. DeVoogd (1989) Morphology of Golgi-impregnated neurons in hyperstriatum ventralis, pars caudalis (HVC) in adult male and female canaries. *Journal of Comparative Neurology* 284: 337-349.
4. Nixdorf-Bergweiler, B.E., M. Lips and U. Heinemann (1995) Electrophysiological and morphological evidence for a new projection of LMAN-neurons towards area X. *NeuroReport* 6 (13): 45-48.
5. Nixdorf-Bergweiler, B.E., Wallhäusser-Franke, E., and T.J. DeVoogd (1995) Regressive development in neuronal structure during song learning in birds. *Journal Neurobiology* 27: 204-215.
6. Wallhäusser-Franke, E., B.E. Nixdorf-Bergweiler, and T.J. DeVoogd (1995) Song isolation is associated with maintaining high spine frequencies on zebra finch LMAN neurons. *Neurobiology of Learning and Memory* 64: 25-35.
7. Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1996) Divergent and parallel development in volume sizes of telencephalic song nuclei in male and female zebra finches. *Journal of Comparative Neurology* 375: 445-456.
8. Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1997) Sexual dimorphism in nucleolar size, shape and number in the lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (LMAN) in birds. *Cytogenetics and Cell Genetics* 76: 77-86.
9. Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1998) Enlargement of neuronal somata in the LMAN coincides with the onset of sensorimotor learning for song. *Neurobiology of Learning and Memory* 69: 258-273.
10. Nixdorf-Bergweiler, B.E., Hintz, V., and G. Kreck. Reverse sex difference in neuronal density develops early in the central core region of song nucleus LMAN as revealed by the disector technique (zur Veröffentlichung eingereicht)

5. 2. Abstracts neuerer eigener Arbeiten

Hintz, V. and B.E. Nixdorf-Bergweiler (1997) Myelination in the lateral nucleus of the anterior neostriatum (LMAN) and the high vocal center (HVC) during development in male and female zebra finches. In N. Elsner and H. Wässle (Eds.), *Neurobiology: From Membrane to Mind, Proc. of the 25th Göttingen Neurobiology Conference (Vol II)*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: p. 344.

Freyer, C. and B.E. Nixdorf-Bergweiler (1998) Morphometric and quantitative analysis of Nucleoli in the zebra finch telencephalic vocal control areas RA and LMAN. In N. Elsner and R. Wehner (Eds.), *New Neuroethology on the Move, Proc. of the 26th Göttingen Neurobiology Conference (Vol I)*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: p.158.

Sandakov, D. and B.E. Nixdorf-Bergweiler (1998) Electrical properties of neurons in the ventral region of song nucleus RA reveal a new projection to HVC in zebra finches. In N. Elsner and R. Wehner (Eds.), *New Neuroethology on the Move, Proc. of the 26th Göttingen Neurobiology Conference (Vol I)*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: p. 159.

Hintz, V., G. Kreck, and B.E. Nixdorf-Bergweiler (1999) Deprivation of memory formation for song in female birds severely affects neuronal structure in song system nuclei. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25: 1891.

Kreck, G. and B.E. Nixdorf-Bergweiler (1999) Evidence for the existence of an anterior forebrain pathway in female zebra finches identified by *in vivo* and *in vitro* tracing techniques. In N. Elsner and U. Eysel (Eds.), *From Molecular Neurobiology to Clinical Neuroscience, Proc. of the 27th Göttingen Neurobiology Conference (Vol I)*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: p. 280.

Nixdorf-Bergweiler, B.E., A. Bindrich, and K.-H. Frommolt (1999) Are introductory notes in zebra finch song genetically determined? IBAC

Nixdorf-Bergweiler, B.E., A. Bindrich, C. Freyer, and V. Hintz (1999) Neuronal and behavioral effects of deprivation for song are multifaceted. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25: 1892.

Nixdorf-Bergweiler, B.E., V. Hintz, G. Kreck, H. Schütze and U. Schneeweiss (2000) Investigation of postsynaptic density in LMAN in social and song deprived zebra finches. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26:2029.

5. 3. Betreute Arbeiten

Lips, M.B. (1994) Elektrophysiologische und neuroanatomische Untersuchungen an *in vitro* Hirnschnittpräparaten des Zebrafinken. Diplomarbeit, Universität Köln.

Hintz, V. (1996) Veränderungen neuronaler Strukturen während der Gesangsprägung im Gehirn von Zebrafinken. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.

Kreck, G. (1998) Vergleichende Untersuchungen zur neuronalen Verschaltung in der rekursiven Vorderhirnschleife des Gesangssystems weiblicher und männlicher Zebrafinken. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.

Freyer, C. (1998) Quantitative und morphometrische Untersuchungen an Nukleoli in den telencephalen Gesangskernen RA und LMAN des Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). Studienjahresarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin

Bindrich, A. (1999) Untersuchungen am Balzgesang akustisch deprivierter Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). Staatsexamensarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.

Steinfelder, S. (2000) Analyse der Afferenzen und Efferenzen des Gesangkerns RA (robust nucleus of the archistriatum) in *Taeniopygia guttata*. Studienjahresarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.

Hintz, V. Untersuchungen zur neuronalen Struktur telencephaler Gesangskerne in normalen und tutordeprivierten Zebrafinken: eine quantitative morphologische Studie. (im Abschluß befindliche) Doktorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.

5. 4. Zitierte Literatur

- Adkins-Regan, E., V. Mansukhani, C. Seiwert, and R. Thompson (1994). Sexual differentiation of brain and behavior in the zebra finch: critical periods for effects of early estrogen treatment. *J. Neurobiol.* 25: 865-877.
- Adret, P. (1993). Operant conditioning, song learning and imprinting to taped song in the zebra finch. *Anim. Behav.* 46: 149-159.
- Alvarez-Buylla, A., and J.R. Kirn (1997). Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J. Neurobiol.* 33: 585-601.
- Alvarez-Buylla, A., J.R. Kirn, and F. Nottebohm (1990). Birth of projection neurons in adult avian brain may be related to perceptual or motor learning. *Science* 249: 1444-1446.
- Alvarez-Buylla, A., C.Y. Ling, and F. Nottebohm (1992). High vocal center growth and its relation to neurogenesis, neuronal replacement and song acquisition in juvenile canaries. *J. Neurobiol.* 23: 396-406.
- Alvarez-Buylla, A., M. Theelen, and F. Nottebohm (1988). Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8722-8726.
- Arnold, A.P. (1980). Quantitative analysis of sex differences in hormone accumulation in the zebra finch brain: methodological and theoretical issues. *J. Comp. Neurol.* 189: 421-436.
- Arnold, A.P., S.W. Bottjer, E.A. Brenowitz, E.J. Nordeen, and K.W. Nordeen (1986). Sexual dimorphisms in the neural vocal control system in song birds: ontogeny and phylogeny. *Brain Behav. Evol.* 28: 22-31.
- Arnold, A.P., F. Nottebohm, and D.W. Pfaff (1976). Hormone concentrating cells in vocal control and other areas of the brain of the zebra finch (*Poephila guttata*). *J. Comp. Neurol.* 165: 487-511.
- Arnold, A.P., and A. Saltiel (1979). Sexual difference in pattern of hormone accumulation in the brain of a songbird. *Science* 205: 702-705.
- Ball, G.F., J.M. Casto, and D.J. Bernard (1994). Sex differences in the volume of avian song control nuclei: comparative studies and the issue of brain nucleus delineation. *Psychoneuroendocrinology* 19: 485-504.
- Basham, M.E., E.J. Nordeen, and K.W. Nordeen (1996). Blockade of NMDA receptors in the anterior forebrain impairs sensory acquisition in the zebra finch (*Poephila guttata*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 66: 295-304.
- Benton, S., J.A. Cardin, and T.J. DeVoogd (1998). Lucifer Yellow filling of area X-projecting neurons in the high vocal center of female canaries. *Brain Res.* 799: 138-147.
- Bischof, H.J. (1997). Song learning, filial imprinting, and sexual imprinting: Three variations of a common theme? *Biomed. Res.* 18: 133-146.
- Bloom, F.E., and G.K. Agajanian (1968). Fine structural and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J. Ultrastruc. Res.* 22: 361-375.
- Bock, J., and K. Braun (1999). Filial imprinting in domestic chicks is associated with spine pruning in the associative area, dorsocaudal neostriatum. *Europ. J. Neurosci.* 11: 2566-2570.
- Böhner, J. (1983). Song learning in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*): Selectivity in the choice of a tutor and accuracy of song copies. *Anim. Behav.* 31: 231-237.
- Böhner, J. (1990). Early acquisition of song in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Anim. Behav.* 39: 369-374.

- Böhner, J. (1991). Ontogenetische Entwicklung von Gesangsaktivität und -struktur beim Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 84: 468-469.
- Böhner, J. (1993). Gesangskopiergenauigkeit und ontogenetische Gesangsaktivität beim Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 86: 231.
- Born, D.E., C.S. Carman, and E.W. Rubel (1987). Correcting errors in estimating neuron area caused by the position of the nucleolus. *J. Comp. Neurol.* 255: 146-152.
- Bottjer, S.W. (1987). Ontogenetic changes in the pattern of androgen accumulation in song-control nuclei of male zebra finches. *J. Neurobiol.* 18(2): 125-139.
- Bottjer, S.W. (1993). The distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brains of male and female zebra finches. *J. Neurobiol.* 24: 51-69.
- Bottjer, S.W., and A.P. Arnold (1984). The role of feedback from the vocal organ. I. Maintenance of stereotypical vocalizations by adult zebra finches. *J. Neurosci.* 4(9): 2387-2396.
- Bottjer, S.W., S.L. Glaessner, and A.P. Arnold (1985). Ontogeny of brain nuclei controlling song learning and behavior in zebra finches. *J. Neurosci.* 5(6): 1556-1562.
- Bottjer, S.W., K.A. Halsema, S.A. Brown, and E.A. Miesner (1989). Axonal connections of a forebrain nucleus involved with vocal learning in zebra finches. *J. Comp. Neurol.* 279: 312-326.
- Bottjer, S.W., and F. Johnson (1997). Circuits, Hormones, and Learning: vocal Behavior in Songbirds. *J. Neurobiol.* 33: 602-618.
- Bottjer, S.W., E.A. Miesner, and A.P. Arnold (1984). Forebrain lesions disrupt development but not maintenance of song in passerine birds. *Science* 224: 901-903.
- Bottjer, S.W., E.A. Miesner, and A.P. Arnold (1986). Changes in neuronal number, density and size account for increases in volume of song-control nuclei during song development in zebra finches. *Neurosci. Lett.* 67: 263-268.
- Bottjer, S.W., and D.R. Sengelaub (1989). Cell death during development of a forebrain nucleus involved with vocal learning in zebra finches. *J. Neurobiol.* 20: 609-618.
- Braaten, R.F., and K. Reynolds (1999). Auditory preference for conspecific song in isolation-reared zebra finches. *Anim. Behav.* 58: 105-111.
- Braun, K., J. Bock, M. Metzger, S. Jiang, and R. Schnabel (1999). The dorsocaudal neostriatum of the domestic chick: a structure serving higher associative functions. *Behav. Brain Res.* 98: 211-218.
- Breedlove, S.M., and A.P. Arnold (1980). Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. *Science* 210: 564-566.
- Brenowitz, E.A. (1991). Altered perception of species-specific song by female birds after lesions of a forebrain nucleus. *Science* 251: 303-305.
- Brenowitz, E.A. (1997). Comparative approaches to the avian song system. *J. Neurobiol.* 33: 517-531.
- Brenowitz, E.A., and A.P. Arnold (1990). The effects of systemic androgen treatment on androgen accumulation in song control regions of the adult female canary brain. *J. Neurobiol.* 21: 837-843.
- Brenowitz, E.A., A.P. Arnold, and R.N. Levin (1985). Neural correlates of female song in tropical duetting birds. *Brain Res.* 343: 104-112.

- Brenowitz, E.A., B. Nalls, D.E. Kroodsma, and C. Horning (1994). Female marsh wrens do not provide evidence of anatomical specializations of song nuclei for perception of male song. *J. Neurobiol.* 25: 197-208.
- Burek, M.J., K.W. Nordeen, and E.J. Nordeen (1991). Neuron loss and addition in developing zebra finch song nuclei are independent of auditory experience during song learning. *J. Neurobiol.* 22: 215-223.
- Burek, M.J., K.W. Nordeen, and E.J. Nordeen (1997). Sexually dimorphic neuron addition to an avian song-control region is not accounted for by sex differences in cell death. *J. Neurobiol.* 33: 61-71.
- Burek, M.J., and R.W. Oppenheim (1996). Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol.* 6: 427-446.
- Burt, J.M., E.A. Brenowitz, M.D. Beecher, and K.L. Lent (1997). Lesions of the avian song nucleus LMAN affect song perception in an operant task. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23: 797.
- Calhoun, S., S.H. Hulse, R.F. Braaten, S.C. Page, and R.J. Nelson (1993). Responsiveness to conspecific and alien song by canaries (*Serinus canaria*) and european starlings (*Sturnus vulgaris*) as a function of photoperiod. *J. Comp. Psychol.* 107: 235-241.
- Canady, R.A., D.E. Kroodsma, and F. Nottebohm (1984). Population differences in complexity of a learned skill are correlated with the brain space involved. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6232-6234.
- Catchpole, C.K., and P.J.B. Slater (1995). *Bird Song: Biological Themes and Variations*, New York: Cambridge University Press.
- Changeux, J.P., and A. Danchin (1976). Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature* 264: 705-712.
- Cherry, J.A., S.A. Tobet, T.J. DeVoogd, and M.J. Baum (1992). Effects of sex and androgen treatment on dendritic dimensions of neurons in the sexually dimorphic preoptic/anterior hypothalamic area of male and female ferrets. *J. Comp. Neurol.* 323: 577-585.
- Cleal, K., S.E. Allan, A.P. King, D.R. Sengelaub, and M.J. West (1996). Perceptual selectivity correlates with LMAN nuclear volume in a non-singing female songbird. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: 1401.
- Constantin-Paton, M., H.T. Cline, and E.A. Debski (1990). Patterned activity, synaptic convergence and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Ann. Rev. Neurosci.* 13: 129-154.
- Cynx, J. (1993). Conspecific song perception in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Psychol.* 107: 395-402.
- Cynx, J., H. Williams, and F. Nottebohm (1990). Timbre discrimination in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) song syllables. *J. Comp. Psychol.* 104: 303-308.
- De Boysson-Bardies, B. (1993). Ontogeny of language-specific syllabic productions. In *Developmental neurocognition: Speech and face processing in the first year of life*, edited by B. De Boysson-Bardies. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 353-363.
- Del Negro, C., M. Gahr, G. Leboucher, and M. Kreutzer (1998). The selectivity of sexual responses to song displays: effects of partial chemical lesion of the HVC in female canaries. *Behav. Brain Res.* 96: 151-159.
- DeVoogd, T., and F. Nottebohm (1981). Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain. *Science* 214: 202-204.
- DeVoogd, T.J., J.A. Cardin, T. Szekeley, J. Büki, and S.W. Newman (1996). Relative volume of LMAN in female wrblers species varies with the number of songs produced by conspecific males. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: 1401.

- DeVoogd, T.J., J.R. Krebs, S.D. Healy, and A. Purvis (1993). Relations between song repertoire size and the volume of brain nuclei related to song: comparative evolutionary analyses amongst oscine birds. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 254: 75-82.
- Doupe, A. (1998). Development and learning in the birdsong system: Are there shared mechanisms? In *Mechanistic Relationships between Development and Learning*, edited by T.J. Carew, R. Menzel and C.J. Shatz. New York: Wiley, pp. 29-52.
- Doupe, A., and P.K. Kuhl (1999). Birdsong and speech: Common themes and mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 567-631.
- Doupe, A.J. (1993). A neural circuit specialized for vocal learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 104-111.
- Doupe, A.J. (1997). Song- and order-selective neurons in the songbird anterior forebrain and their emergence during vocal development. *J. Neurosci.* 17: 1147-1167.
- Doupe, A.J., M.S. Brainard, and N.A. Hessler (2000). The song system: neural circuits essential throughout life for vocal behavior and plasticity. In *The New Cognitive Neurosciences*, edited by M.S. Gazzaniga. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pp. 451-467.
- Doupe, A.J., and M. Konishi (1991). Song-selective auditory circuits in the vocal control system of the zebra finch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 11339-11343.
- Doya, K., and T. Sejnowski (1995). A novel reinforcement model of birdsong vocalization learning. In *Advances in Neural Information Processing Systems*, edited by G. Tesauro, D.S. Touretzky and T.K. Leen. Cambridge, MA: MIT Press, pp. 101-108.
- Doya, K., and T.J. Sejnowski (2000). A computational model of avian song learning. In *The New Cognitive Neurosciences*, edited by M.S. Gazzaniga. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pp. 469-482.
- Dutar, P., H.M. Vu, and D.J. Perkel (1998). Multiple cell types distinguished by physiological, pharmacological, and anatomic properties in nucleus HVC of the adult zebra finch. *J. Neurophysiol.* 80: 1828-1838.
- Eales, L.A. (1985). Song learning in zebra finches: some effects of song modes availability on what is learnt and when. *Anim. Behav.* 33: 1295-1300.
- Eales, L.A. (1987). Song learning in female-raised zebra finches: another look at the sensitive phase. *Anim. Behav.* 35: 1356-1365.
- Fortune, E.S., and D. Margoliash (1995). Parallel pathways and convergence onto HVC and adjacent neostriatum of adult zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Neurol.* 360: 413-441.
- Foster, E.F., R.P. Mehta, and S.W. Bottjer (1997). Axonal connections of the medial magnocellular nucleus of the anterior neostriatum in zebra finches. *J. Comp. Neurol.* 382: 364-381.
- Gahr, M. (1990). Delineation of a brain nucleus: comparisons of cytochemical, hodological, and cytoarchitectural views of the song control nucleus HVC of the adult canary. *J. Comp. Neurol.* 294: 30-36.
- Gahr, M., and M. Konishi (1988). Developmental changes in estrogen-sensitive neurons in the forebrain of the zebra finch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 7380-7383.
- Giacometti, S., E. Scherini, and G. Bernocchi (1989). Seasonal changes in the nucleoli of Purkinje cells of the hedgehog cerebellum. *Brain Res.* 488: 365-368.
- Goessens, G. (1984). Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.* 87: 107-158.

- Goldman, S.A., and F. Nottebohm (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2390-2394.
- Gong, A., F.W. Freking, J. Wingfield, B.A. Schlinger, and A.P. Arnold (1999). Effects of embryonic treatment with fadrozole on phenotype of gonads, syrinx, and neural song system in zebra finches. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115: 346-353.
- Grisham, W., and A.P. Arnold (1994). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the song system of the zebra finch. *Brain Res.* 651: 115-122.
- Grisham, W., and A.P. Arnold (1995). A direct comparison of the masculinizing effects of testosterone, androstenedione, estrogen, and progesterone on the development of the zebra finch song system. *J. Neurobiol.* 26: 163-170.
- Grisham, W., A. Tam, C.M. Greco, B.A. Schlinger, and A.P. Arnold (1997). A putative 5 alpha-reductase inhibitor demasculinizes portions of the zebra finch song system. *Brain Res.* 750: 122-128.
- Gurney, M.E. (1982). Behavioral correlates of sexual differentiation in the zebra finch song system. *Brain Res.* 231: 153-172.
- Güttinger, H.R. (1979). The integration of learnt and genetically programmed behaviour: a study of hierarchical organization in songs of canaries, greenfinch and their hybrids. *Z. Tierpsychol.* 49: 285-303.
- Güttinger, H.R., G. Herth, S. Stocker, K.W. Kafitz, and M. Kallenbach (1993). Antioestrogen inhibits myelination in brains of juvenile zebra finches. *Neuroreport* 4: 1019-1022.
- Hamilton, K.S., A.P. King, D.R. Sengelaub, and M.J. West (1997). A brain of her own: a neural correlate of song assessment in female songbird. *Neurobiol. Learning Mem.* 68: 325-332.
- Hebb, D.O. (1949). *The Organization of Behavior: Neuropsychological Theory*, New York: John Wiley and Sons.
- Herrmann, K., and A.P. Arnold (1991a). Lesions of HVc block the developmental masculinizing effects of estradiol in the female zebra finch song system. *J. Neurobiol.* 22: 29-39.
- Herrmann, K., and A.P. Arnold (1991b). The development of afferent projections to the robust archistriatal nucleus in male zebra finches: a quantitative electron microscopic study. *J. Neurosci.* 11: 2063-2074.
- Herrmann, K., and H.J. Bischof (1986). Delayed development of song control nuclei in the zebra finch is related to behavioral development. *J. Comp. Neurol.* 245: 167-175.
- Holzenberger, M., E.D. Jarvis, C. Chong, M. Grossman, F. Nottebohm, and C. Scharff (1997). Selective expression of insulin-like growth factor II in the songbird brain. *J. Neurosci.* 17: 6974-6987.
- Hultsch, H., and D. Todt (1989). Context memorization in the song-learning of birds. *Naturwissenschaften* 76: 584-586.
- Hultsch, H., and D. Todt (1996). Discontinuous and incremental processes in the song learning of birds: evidence for a primer effect. *J. Comp. Physiol.* 179: 291-299.
- Immelmann, K. (1969). Song development in the zebra finch and other estrildid finches. In *Bird Vocalizations: Their Relation to Current Problems in Biology and Psychology*, edited by R.A. Hinde. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 61-74.
- Iyengar, S., S.S. Viswanathan, and S.W. Bottjer (1999). Development of topography within song control circuitry of zebra finches during the sensitive period for song learning. *J. Neurosci.* 19: 6037-6057.

- Jacobs, E.C., W. Grisham, and A.P. Arnold (1995). Lack of a synergistic effect between estradiol and dihydrotestosterone in the masculinization of the zebra finch song system. *J. Neurobiol.* 27: 513-519.
- Janata, P., and D. Margoliash (1999). Gradual emergence of song selectivity in sensorimotor structures of the male zebra finch song system. *J. Neurosci.* 19: 5108-5118.
- Johnson, F., and S.W. Bottjer (1992). Growth and regression of thalamic efferents in the song- control system of male zebra finches. *J. Comp. Neurol.* 326: 442-450.
- Johnson, F., and S.W. Bottjer (1993). Induced cell death in a thalamic nucleus during a restricted period of zebra finch vocal development. *J. Neurosci.* 13: 2452-2462.
- Johnson, F., M.M. Sablan, and S.W. Bottjer (1995). Topographic organization of a forebrain pathway involved with vocal learning in zebra finches. *J. Comp. Neurol.* 358: 260-278.
- Jones, A.E., C. Ten Cate, and P.J.B. Slater (1996). Early experience and plasticity of song in adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Psychol.* 110: 354-369.
- Jones, D.G., W. Itarat, and R.K.S. Calverley (1991). Perforated Synapses and Plasticity: A Developmental Overview. *Mol. Neurobiol.* 5: 217-228.
- Kamel, H.M., J. Kirk, and P.G. Toner (1990). Ultrastructural pathology of the nucleus. *Curr. Top. Pathol.* 82: 17-89.
- Karten, H.J. (1991). Homology and evolutionary origins of the 'neocortex'. *Brain. Behav. Evol.* 38: 264-272.
- Katz, L.C., and M.E. Gurney (1981). Auditory responses in the zebra finch's motor system for song. *Brain Res.* 211: 192-197.
- Kelley, D.B., and F. Nottebohm (1979). Projections of a telencephalic auditory nucleus-field L- in the canary. *J. Comp. Neurol.* 183: 455-469.
- Kimpo, R.R., and A.J. Doupe (1997). FOS is induced by singing in distinct neuronal populations in a motor network. *Neuron* 18: 315-325.
- King, A.P., and M.J. West (1990). *Variation in Species-Typical Behavior: A Contemporary Theme for Comparative Psychology*, edited by D.A. Dewsbury. Sutherland MA: Sinauer.
- Kirn, J., B. O'Loughlin, S. Kasparian, and F. Nottebohm (1994). Cell death and neuronal recruitment in the high vocal center of adult male canaries are temporally related to changes in song [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 7844-7848.
- Kirn, J.R., A. Alvarez-Buylla, and F. Nottebohm (1991). Production and survival of projection neurons in a forebrain vocal center of adult male canaries. *J. Neurosci.* 11: 1756-1762.
- Kirn, J.R., and T.J. DeVoogd (1989). Genesis and death of vocal control neurons during sexual differentiation in the zebra finch. *J. Neurosci.* 9: 3176-3187.
- Kirn, J.R., Y. Fishman, K. Sasportas, A. Alvarez-Buylla, and F. Nottebohm (1999). The fate of new neurons in adult canary brain during the first 30 days after their formation. *J. Comp. Neurol.* 411: 487-494.
- Kirn, J.R., and F. Nottebohm (1993). Direct evidence for loss and replacement of projection neurons in adult canary brain. *J. Neurosci.* 13: 1654-1663.
- Kirn, J.R., and H. Schwabl (1997). Photoperiod regulation of neuron death in the adult canary. *J. Neurobiol.* 33: 223-231.

- Konishi, M. (1965). Effects of deafening on song development in American robins and black-headed grosbeaks. *Z. Tierpsychol.* 22: 584-599.
- Konishi, M., and E. Akutagawa (1985). Neuronal growth, atrophy and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch brain. *Nature* 315: 145-147.
- Konishi, M., and E. Akutagawa (1987). Hormonal control of cell death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch. *Ciba Found. Symp.* 126: 173-185.
- Konishi, M., and E. Akutagawa (1988). A critical period for estrogen action on neurons of the song control system in the zebra finch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 7006-7007.
- Konishi, M., and E. Akutagawa (1990). Growth and atrophy of neurons labeled at their birth in a song nucleus of the zebra finch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 3538-3541.
- Konishi, M., and F. Nottebohm (1969). Experimental studies in the ontogeny of avian vocalizations. In *Bird Vocalizations*, edited by R.A. Hinde. Cambridge: University Press, pp. 29-48.
- Korsia, S., and S.W. Bottjer (1989). Developmental changes in the cellular composition of a brain nucleus involved with song learning in zebra finches. *Neuron* 3: 451-460.
- Korsia, S., and S.W. Bottjer (1991). Chronic testosterone treatment impairs vocal learning in male zebra finches during a restricted period of development. *J. Neurosci.* 11: 2362-2371.
- Korzeniewska, E., and O. Güntürkün (1990). Sensory properties and afferents of the N. dorsolateralis posterior thalami of the pigeon. *J. Comp. Neurol.* 292: 457-479.
- Kubota, M., and I. Taniguchi (1998). Electrophysiological characteristics of classes of neuron in the HVC of the zebra finch. *J. Neurophysiol.* 80: 914-923.
- Kuhl, P.K. (2000). Language, mind, and brain: Experience alters perception. In *The New Cognitive Neurosciences*, edited by M.S. Gazzaniga. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pp. 99-115.
- Kuhl, P.K., and A.N. Meltzoff (1996). Infant vocalization in response to speech: Vocal imitation and developmental change. *J. Acoust. Soc. Amer.* 100: 2425-2438.
- Leonard, S.L. (1939). Induction of singing in female canaries by injections of male hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 41: 229-230.
- Lewicki, M.S. (1996). Intracellular characterization of song-specific neurons in the zebra finch auditory forebrain. *J. Neurosci.* 16: 5855-5863.
- Lewicki, M.S., and M. Konishi (1995). Mechanisms underlying the sensitivity of songbird forebrain neurons to temporal order. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 5582-5586.
- Margoliash, D., and E.S. Fortune (1992). Temporal and harmonic combination-sensitive neurons in the zebra finch's HVC. *J. Neurosci.* 12: 4309-4326.
- Margoliash, D., E.S. Fortune, M.L. Sutter, A.C. Yu, B.D. Wren-Hardin, and A. Dave (1994). Distributed representation in the song system of oscines: Evolutionary implications and functional consequences. *Brain Behav. Evol.* 44: 247-264.
- Markowitsch, H.J. (2000). The anatomical bases for memory. In *The New Cognitive Neurosciences*, edited by M.S. Gazzaniga. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pp. 781-795.
- Marler, P. (1990). Song learning: The interface between behaviour and neuroethology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.]* 329: 109-114.

- Marler, P. (1997). Three models of song learning: evidence from behavior. *J. Neurobiol.* 33: 501-516.
- Marler, P., and S. Peters (1977). Selective vocal learning in a sparrow. *Science* 198: 519-521.
- Marler, P., and S. Peters (1981). Sparrows learn adult song and more from memory. *Science* 213: 780-782.
- Marler, P., and V. Sherman (1983). Song structure without auditory feedback: emendations of the auditory template hypothesis. *J. Neurosci.* 3: 517-531.
- Marler, P., and M.S. Waser (1977). Role of auditory feedback in canary song development. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91: 8-16.
- McCasland, J.S. (1987). Neuronal control of bird song production. *J. Neurosci.* 7: 23-39.
- McCasland, J.S., and M. Konishi (1981). Interaction between auditory and motor activities in an avian song control nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 7815-7819.
- Mello, C.V., G.E. Vates, S. Okuhata, and F. Nottebohm (1998). Descending auditory pathways in the adult male zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Neurol.* 395: 137-160.
- Miller, D.D. (1979). Long-term recognition of father's song by female zebra finches. *Nature* 280: 389-391.
- Mooney, R. (1992). Synaptic basis for developmental plasticity in a birdsong nucleus. *J. Neurosci.* 12: 2464-2477.
- Mooney, R., and M. Konishi (1991). Two distinct inputs to an avian song nucleus activate different glutamate receptor subtypes on individual neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 4075-4079.
- Mooney, R., and M. Rao (1994). Waiting periods versus early innervation: the development of axonal connections in the zebra finch song system. *J. Neurosci.* 14: 6532-6543.
- Morrison, R.G., and F. Nottebohm (1993). Role of a telencephalic nucleus in the delayed song learning of socially isolated zebra finches. *J. Neurobiol.* 24: 1045-1064.
- Nordeen, E.J., A. Grace, M.J. Burek, and K.W. Nordeen (1992b). Sex-dependent loss of projection neurons involved in avian song learning. *J. Neurobiol.* 23: 671-679.
- Nordeen, E.J., and K.W. Nordeen (1988). Sex and regional differences in the incorporation of neurons born during song learning in zebra finches. *J. Neurosci.* 8: 2869-2874.
- Nordeen, K.W., and E.J. Nordeen (1992a). Auditory feedback is necessary for the maintenance of stereotyped song in adult zebra finches. *Behav. Neural Biol.* 57: 58-66.
- Nordeen, K.W., and E.J. Nordeen (1997). Anatomical and synaptic substrates for avian song learning. *J. Neurobiol.* 33: 532-548.
- Nordeen, K.W., E.J. Nordeen, and A.P. Arnold (1986). Estrogen establishes sex differences in androgen accumulation in zebra finch brain. *J. Neurosci.* 6: 734-738.
- Nordeen, K.W., E.J. Nordeen, and A.P. Arnold (1987). Estrogen accumulation in zebra finch song control nuclei: implications for sexual differentiation and adult activation of song behavior. *J. Neurobiol.* 18: 569-582.
- Nottebohm, F. (1968). Auditory experience and song development in the chaffinch (*Fringilla coelebs*). *Ibis* 111: 549-568.

- Nottebohm, F. (1980). Testosterone triggers growth of brain vocal control nuclei in adult female canaries. *Brain Res.* 189: 429-436.
- Nottebohm, F. (1981). A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science* 214: 1368-1370.
- Nottebohm, F. (1987). Birdsong. In *Encyclopedia of Neuroscience*, edited by G. Adelman. Boston: Birkhäuser Boston Inc., pp. 133-136.
- Nottebohm, F. (1993). The search for neural mechanisms that define the sensitive period for song learning in birds. *Netherlands J. Zool.* 43: 193-234.
- Nottebohm, F., A. Alvarez-Buylla, J. Cynx, J. Kirn, C.Y. Ling, M. Nottebohm, R. Suter, A. Tolles, and H. Williams (1990). Song learning in birds: the relation between perception and production. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 329: 115-124.
- Nottebohm, F., and A.P. Arnold (1976). Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 194: 211-213.
- Nottebohm, F., D.B. Kelley, and J.A. Paton (1982). Connections of vocal control nuclei in the canary telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 207: 344-357.
- Nottebohm, F., and M.E. Nottebohm (1978). Relationship between song repertoire and age in the canary *Serinus canaria*. *Z. Tierpsychol.* 46: 298-305.
- Nottebohm, F., M.E. Nottebohm, and L. Crane (1986). Developmental and seasonal changes in canary song and their relation to changes in the anatomy of song-control nuclei. *Behav. Neural Biol.* 46: 445-471.
- Nottebohm, F., T.M. Stokes, and C.M. Leonard (1976). Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. *J. Comp. Neurol.* 165: 457-486.
- Okanoya, K. (1997). Voco-auditory behavior in the Bengalese finch: A comparison with the zebra finch. *Biomed Res.* 18: 53-70.
- Okuhata, S., and N. Saito (1987). Synaptic connections of thalamo-cerebral vocal nuclei of the canary. *Brain Res. Bull.* 18: 35-44.
- Oller, D.K., and P.F. MacNeilage (1983). Development of speech production: Perspectives from natural and perturbed speech. In *The Production of Speech*, edited by P.F. MacNeilage. New York: Springer-Verlag, pp. 91-108.
- Paton, J.A., and F.N. Nottebohm (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225: 1046-1048.
- Paton, J.A., B.E. O'Loughlin, and F. Nottebohm (1985). Cells born in adult canary forebrain are local interneurons. *J. Neurosci.* 5: 3088-3093.
- Peters, A., S.L. Palay, and H.d. Webster (1992). *The fine structure of the nervous system*, edited by A. Peters. New York: Oxford University Press.
- Pohl-Apel, G., and R. Sossinka (1984). Hormonal determination of song capacity in females of the zebra finch: critical phase of treatment. *Z. Tierpsychol.* 64: 330-336.
- Price, P.H. (1979). Developmental determinations of structure in zebra finch song. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93: 260-277.

- Rakic, P., J.P. Burgeois, M.F. Eckenhoff, N. Zecevic, and P.S. Goldman-Rakic (1986). Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science* 232: 232-235.
- Rausch, G., and H. Scheich (1982). Dendritic spine loss and enlargement during maturation of the speech control system in the mynah bird (*Gracula religiosa*). *Neurosci. Lett.* 29: 129-133.
- Reiner, A., H.J. Karten, and A.R. Solina (1983). Substance P: localization within the paleostriatal-tegmental pathway in the pigeon. *Neuroscience* 9: 61-85.
- Rollenhagen, A., and H.J. Bischof (1991). Rearing conditions affect neuron morphology in a telencephalic area of the zebra finch. *Neuroreport* 2: 711-714.
- Rollenhagen, A., and H.J. Bischof (1996). Activity-dependent plasticity in visual forebrain areas of the zebra finch. *Behav. Brain Res.* 81: 207-213.
- Rollenhagen, A., and H.J. Bischof (1998). Spine density changes in forebrain areas of the zebra finch by TEA-induced potentiation. *Neuroreport* 9: 2325-2329.
- Ruan, J., and R.A. Suthers (1996). Myotopic representation of syringeal muscles in the hypoglossal nucleus of the cowbird. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: 1402.
- Sakaguchi, H., K. Wada, M. Maekawa, T. Watsuji, and M. Hagiwara (1999). Song-induced phosphorylation of cAMP response element-binding protein in the songbird brain. *J. Neurosci.* 19: 3973-3981.
- Scharff, C., J.R. Kirn, M. Grossman, J.D. Macklis, and F. Nottebohm (2000). Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds. *Neuron* 25: 481-492.
- Scharff, C., and F. Nottebohm (1991). A comparative study of the behavioral deficits following lesions of various parts of the zebra finch song system: implications for vocal learning. *J. Neurosci.* 11: 2896-2913.
- Scharff, C., F. Nottebohm, and J. Cynx (1998). Conspecific and heterospecific song discrimination in male zebra finches with lesions in the anterior forebrain pathway. *J. Neurobiol.* 36: 81-90.
- Scheer, U., and R. Benavente (1990). Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bioessays* 12: 14-21.
- Scheich, H., E. Wallhäusser-Franke, and K. Braun (1991). Does synaptic selection explain auditory imprinting? In *Memory: Organization and Locus of Change*, edited by L.R. Squire, N. M. Weinberger, G. Lynch, and J. L. McGaugh. New York: Oxford University Press, pp. 114-159.
- Schlinger, B.A., and A.P. Arnold (1991). Androgen effects on the development of the zebra finch song system. *Brain Res.* 561: 99-105.
- Schmidt, M.F., and D.J. Perkel (1998). Slow synaptic inhibition in nucleus HVC of the adult zebra finch. *J. Neurosci.* 18: 895-904.
- Schultz, W., P. Apicella, and T. Ljungberg (1993). Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J. Neurosci.* 13: 900-913.
- Shatz, C.J. (1996). Emergence of order in visual system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 602-608.
- Shepherd, G. (1994). *Neurobiology*, New York: Oxford University Press.
- Simpson, H.B., and D.S. Vicario (1990). Brain pathways for learned and unlearned vocalizations differ in zebra finches. *J. Neurosci.* 10: 1541-1556.

- Simpson, H.B., and D.S. Vicario (1991). Early estrogen treatment of female zebra finches masculinizes the brain pathway for learned vocalizations. *J. Neurobiol.* 22: 777-793.
- Slater, P.J.B., L.A. Eales, and N.S. Clayton (1988). Song learning in zebra finches (*Taeniopygia guttata*): progress and prospects. *Adv. Study Behav.* 18: 1-34.
- Slater, P.J.B., A. Jones, and C. Ten Cate (1993). Can lack of experience delay the end of the sensitive phase for song learning? *Netherlands J. Zool.* 43: 80-90.
- Sohrabji, F., E.J. Nordeen, and K.W. Nordeen (1990). Selective impairment of song learning following lesions of a forebrain nucleus in the juvenile zebra finch. *Behav. Neural Biol.* 53: 51-63.
- Solis, M.M., and A.J. Doupe (1997). Anterior forebrain neurons develop selectivity by an intermediate stage of birdsong learning. *J. Neurosci.* 17: 6447-6462.
- Solis, M.M., and A.J. Doupe (1999). Contributions of tutor and bird's own song experience to neural selectivity in the songbird anterior forebrain. *J. Neurosci.* 19: 4559-4584.
- Solis, M.M., and A.J. Doupe (2000). Compromised neural selectivity for song in birds with impaired sensorimotor learning. *Neuron* 25: 109-121.
- Sossinka, R., and J. Böhner (1980). Song types in the zebra finch *Poephila guttata castanotis*. *Z. Tierpsychol.* 53: 123-132.
- Spiro, J.E., M.B. Dalva, and R. Mooney (1999). Long-range inhibition within the zebra finch song nucleus RA can coordinate the firing of multiple projection neurons. *J. Neurophysiol.* 81: 3007-3020.
- Sterio, D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134: 127-136.
- Stevenson, J.G. (1967). Reinforcing effects of chaffinch song. *Anim. Behav.* 15: 427-432.
- Stocker, S., H.R. Güttinger, and G. Herth (1994). Exogenous testosterone differentially affects myelination and neurone soma sizes in the brain of canaries. *Neuroreport* 5: 1449-1452.
- Stoel-Gammon, C., and K. Otomo (1986). Babbling development of hearing-impaired and normally hearing subjects. *J. Speech Hear. Disord.* 51: 33-41.
- Striedter, G.F., and E.T. Vu (1998). Bilateral feedback projections to the forebrain in the premotor network for singing zebra finches. *J. Neurobiol.* 34: 27-40.
- Suthers, R. (1990). Contributions to birdsong from the left and right sides of the intact syrinx. *Nature* 347: 473-477.
- Tchernichovski, O., T. Lints, P.P. Mitra, and F. Nottebohm (1999). Vocal imitation in zebra finches is inversely related to model abundance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 12901-12904.
- Theunissen, F.E., and A.J. Doupe (1998). Temporal and spectral sensitivity of complex auditory neurons in the nucleus HVC of male zebra finches. *J. Neurosci.* 18: 3786-3802.
- Tramontin, A.D., G.T. Smith, C.W. Breuner, and E.A. Brenowitz (1998). Seasonal plasticity and sexual dimorphism in the avian song control system: Stereological measurement of neuron density and number. *J. Comp. Neurol.* 396: 186-192.
- Underwood, J.C.E. (1990). *Pathology of the Nucleus.*, Berlin Heidelberg: Springer.

- van der Knaap, M.S., J. Valk, C.J. Bakker, M. Schooneveld, J.A. Faber, J. Willemse, and R.H. Gooskens (1991). Myelination as an expression of the functional maturity of the brain. *Dev. Med. Child Neurol.* 33: 849-857.
- Vates, G.E., B.M. Broome, C.V. Mello, and F. Nottebohm (1996). Auditory pathways of caudal telencephalon and their relation to the song system of adult male zebra finches. *J. Comp. Neurol.* 366: 613-642.
- Vates, G.E., and F. Nottebohm (1995). Feedback circuitry within a song-learning pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 5139-5143.
- Vates, G.E., D.S. Vicario, and F. Nottebohm (1997). Reafferent thalamo- "cortical" loops in the song system of oscine songbirds. *J. Comp. Neurol.* 380: 275-290.
- Vicario, D.S. (1991). Contributions of syringeal muscles to respiration and vocalization in the zebra finch. *J. Neurobiol.* 22: 63-73.
- Vicario, D.S. (1993). A new brain stem pathway for vocal control in the zebra finch song system. *Neuroreport* 4: 983-986.
- Vicario, D.S., and F. Nottebohm (1988). Organization of the zebra finch song control system: I. Representation of syringeal muscles in the hypoglossal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 271: 346-354.
- Vicario, D.S., and K.H. Yohay (1993). Song-selective auditory input to a forebrain vocal control nucleus in the zebra finch. *J. Neurobiol.* 24: 488-505.
- Volman, S. (1993). Development of neural selectivity for birdsong during vocal learning. *J. Neurosci.* 13: 4737-4747.
- Volman, S.F., and H. Khanna (1995). Convergence of untutored song in group-reared zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Psychol.* 109: 211-221.
- Vu, E.T., M.E. Mazurek, and Y.-C. Kuo (1994). Identification of a forebrain motor programming network for the learned song of zebra finches. *J. Neurosci.* 14: 6924-6934.
- Waldmann, C., and O. Güntürkün (1993). The dopaminergic innervation of the pigeon caudolateral forebrain: Immunocytochemical evidence for a 'prefrontal cortex' in birds. *Brain Res.* 600: 225-234.
- Wallhäusser, E., and H. Scheich (1987). Auditory imprinting leads to differential 2-deoxyglucose uptake and dendritic spine loss in the chick rostral forebrain. *Brain Res.* 428: 29-44.
- Wallhäusser-Franke, E., C.E. Collins, and T.J. DeVogd (1995). Developmental changes in the distribution of NADPH-diaphorase- containing neurons in telencephalic nuclei of the zebra finch song system. *J. Comp. Neurol.* 356: 345-354.
- Wang, J., H. Sakaguchi, and M. Sokabe (1999). Sex differences in the vocal motor pathway of the zebra finch revealed by real-time optical imaging technique. *Neuroreport* 10: 2487-2491.
- Ward, B.C., E.J. Nordeen, and K.W. Nordeen (1998). Individual variation in neuron number predicts differences in the propensity for avian vocal imitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 1277-1282.
- Weichel, K., G. Schwager, P. Heid, H.R. Güttinger, and A. Pesch (1986). Sex differences in plasma steroid concentrations and singing behaviour during ontogeny in canaries (*Serinus canaria*). *Ethology* 73: 281-294.
- White, S.A., F.S. Livingston, and R. Mooney (1999). Androgens modulate NMDA receptor-mediated EPSCs in the zebra finch song system. *J. Neurophysiol.* 82: 2221-2234.
- Wild, J.M. (1993a). Descending projections of the songbird nucleus robustus archistriatalis. *J. Comp. Neurol.* 338: 225-241.

- Wild, J.M. (1993b). The avian nucleus retroambigualis: a nucleus for breathing, singing and calling. *Brain Res.* 606: 319-324.
- Wild, J.M. (1997). Neural pathways for the control of birdsong production. *J. Neurobiol.* 33: 653-670.
- Williams, H. (1989). Multiple representations and auditory-motor interactions in the avian song system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 563: 148-164.
- Williams, H., and R. Mc Kibben (1992). Changes in stereotyped central motor patterns controlling vocalization are induced by peripheral nerve injury. *Behav. Neural Biol.* 57: 67-78.
- Williams, H., and N. Metha (1999). Changes in adult zebra finch song require a forebrain nucleus that is not necessary for song production. *J. Neurobiol.* 39: 14-28.
- Williams, H., and F. Nottebohm (1985). Auditory responses in avian vocal motor neurons: a motor theory for song perception in birds. *Science* 229: 279-282.
- Williams, H., and D.S. Vicario (1993). Temporal patterning of song production: Participation of nucleus uvulaeformis of the thalamus. *J. Neurobiol.* 24: 903-912.
- Wolff, J.R. (1981). Some morphogenetic aspects of the development of the central nervous system. In *Behavioral Development: The Bielefeld Interdisciplinary Project*, edited by K. Immelmann, G.W. Barlow, L. Petrinovich, and M. Main. Cambridge, MA: Cambridge University Press, pp. 164-190.
- Wynne, B., and O. Güntürkün (1995). Dopaminergic innervation of the telencephalon of the Pigeon (*Columba livia*): A study with antibodies against tyrosine hydroxylase and dopamine. *J. Comp. Neurol.* 357: 446-464.
- Yu, A.C., and D. Margoliash (1996). Temporal hierarchical control of singing in birds. *Science* 273: 1871-1875.
- Zann, R. (1993). Structure, sequence and evolution of song elements in wild Australian zebra finches. *The Auk* 110: 702-715.

VI. WEITERE PUBLIKATIONEN DER HABILITANDIN

11. Nixdorf, B.E., and H.J. Bischof (1982) Afferent connections of the ectostriatum and visual wulst in the zebra finch (*Taeniopygia guttata* GOULD) -an HRP study. *Brain Research* 248: 9-17.
12. Nixdorf, B., and H.J. Bischof (1986) Posthatching development of synapses in the neuropil of nucleus rotundus of the zebra finch: A quantitative electron microscopic study. *Journal Comparative Neurology* 250: 133-139.
13. Nixdorf, B., and H.J. Bischof (1987) Ultrastructural effects of monocular deprivation in the neuropil of nucleus rotundus in the zebra finch: A quantitative electron microscopic study. *Brain Research* 405: 326-336.
14. Nixdorf, B.E. (1989) Ultrastructural analysis of the development and maturation of synapses and subsynaptic structures in the ectostriatum of the zebra finch. *Journal Comparative Neurology* 290: 472-486.
15. Nixdorf, B.E. (1990) Monocular deprivation alters the development of synaptic structure in the ectostriatum of the zebra finch. *Synapse* 5: 224-232.
16. Nixdorf, B.E. (1990) Synaptic remodelling of perforated synapses during development and maturation in a visual projection area in birds. *Synapse* 6: 230-235.
17. Nixdorf-Bergweiler, B.E., Albrecht, D., and U. Heinemann (1994) Developmental changes in the number, size and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 12: 180-195.

BUCHARTIKEL

18. Heinemann, U., Albrecht, D., Beck, H., Ficker, E., vHaebler, D., Nixdorf, B., and J. Stabel (1993) Potassium homeostasis and epileptogenesis in the immature hippocampus. In: *Epileptogenic and Excitotoxic Mechanisms*. A. Avanzini, R. Fariello, U. Heinemann, and R. Mutani (Eds.), John Libbey & Company Ltd., pp. 99-106.

VII. SONDERDRUCKE und MANUSKRIFT

(Dieser Teil der Habilitationsschrift befindet sich in einem gesonderten Band)

1. DeVoogd, T.J., B. Nixdorf, and F. Nottebohm (1985) Synaptogenesis and changes in synaptic morphology related to acquisition of a new behavior. *Brain Research* 329: 304-308.
2. Clower, R., B.E. Nixdorf, and T.J. DeVoogd (1989) Synaptic plasticity in the hypoglossal nucleus of female canaries: structural correlates of season, hemisphere and testosterone treatment. *Behavioral and Neural Biology* 52: 63-77.
3. Nixdorf, B.E., S.S. Davis, and T.J. DeVoogd (1989) Morphology of Golgi-impregnated neurons in hyperstriatum ventralis, pars caudalis (HVC) in adult male and female canaries. *Journal of Comparative Neurology* 284: 337-349.
4. Nixdorf-Bergweiler, B.E., M. Lips and U. Heinemann (1995) Electrophysiological and morphological evidence for a new projection of LMAN-neurons towards area X. *NeuroReport* 6 (13): 45-48.
5. Nixdorf-Bergweiler, B.E., Wallhäusser-Franke, E., and T.J. DeVoogd (1995) Regressive development in neuronal structure during song learning in birds. *Journal Neurobiology* 27: 204-215.
6. Wallhäusser-Franke, E., B.E. Nixdorf-Bergweiler, and T.J. DeVoogd (1995) Song isolation is associated with maintaining high spine frequencies on zebra finch LMAN neurons. *Neurobiology of Learning and Memory* 64: 25-35.
7. Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1996) Divergent and parallel development in volume sizes of telencephalic song nuclei in male and female zebra finches. *Journal of Comparative Neurology* 375: 445-456.
8. Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1997) Sexual dimorphism in nucleolar size, shape and number in the lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (LMAN) in birds. *Cytogenetics and Cell Genetics* 76: 77-86.
9. Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1998) Enlargement of neuronal somata in the LMAN coincides with the onset of sensorimotor learning for song. *Neurobiology of Learning and Memory* 69: 258-273.
10. Nixdorf-Bergweiler, B.E., Hintz, V., and G. Kreck. Reverse sex difference in neuronal density develops early in the central core region of song nucleus LMAN as revealed by the disector technique (zur Veröffentlichung eingereicht)